



**Vera Alexandra Quintino Damião**

Licenciada em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

**Produção de DNases extracelulares em  
estirpes de *Streptococcus agalactiae* de  
origem humana e bovina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Professora Doutora Ilda Santos Sanches,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientador: Doutora Maria José Borrego, Instituto Nacional  
de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Vogal: Doutora Maria José Gonçalves Gaspar Borrego



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**Vera Alexandra Quintino Damião**

Licenciada em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

**Produção de DNases extracelulares em  
estirpes de *S. agalactiae* de origem humana  
e bovina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Professora Doutora Ilda Santos Sanches,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientador: Doutora Maria José Borrego, Instituto Nacional  
de Saúde Dr. Ricardo Jorge

A escrita da dissertação não foi realizada com base nas normas do novo  
acordo ortográfico



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2012**

Produção de DNases extracelulares em estirpes de *Streptococcus agalactiae* de origem humana e bovina

Copyright [Vera Alexandra Quintino Damião], FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Agradecimentos

Desde o início deste trabalho que foi possível contar com a confiança e apoio de várias pessoas. Após o seu término resta-me registar os meus sinceros agradecimentos às individualidades, que de várias formas contribuíram para que o mesmo se tornasse numa realidade.

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, e em particular ao Departamento de Doenças Infecciosas, a oportunidade e as condições disponibilizadas para a realização do presente trabalho.

Às minhas orientadoras Professora Doutora Ilda Sanches e Doutora Maria José Borrego, pelo acompanhamento, esclarecimentos e apoio prestados.

Ao Doutor Baltazar Nunes pelos esclarecimentos e apoio na realização da análise estatística.

À Doutora Ana Tenreiro pelo apoio e disponibilidade demonstrados no decorrer de alguns ensaios que tiveram lugar no ICAT.

À Doutora Lélia Chambel pelos preciosos esclarecimentos relativamente ao software BioNumerics.

À Doutora Márcia Rato e Doutora Barbara Spellerberg pelas estirpes gentilmente cedidas.

Aos meus colegas de trabalho, Rita Ferreira, Vítor Borges e em especial a Carlos Florindo pela dedicação, disponibilidade, compreensão e amizade patenteadas, pelos conhecimentos transmitidos, pelos desafios colocados na realização deste trabalho bem como pelo estímulo e exigência crescentes, contribuindo desta forma para o fortalecimento de valores intelectuais, científicos e tecnológicos, os quais me proporcionaram um grande enriquecimento cognitivo e pessoal.

A todos os amigos e familiares pelas oportunas manifestações de companheirismo e encorajamento.

A todos o meu profundo e sincero agradecimento.

## Resumo

*Streptococcus agalactiae* constitui uma das principais causas de pneumonia, septicémia e meningite em recém-nascidos e infecção emergente em adultos com patologia associada. A secreção de DNases é considerada vantajosa na disseminação bacteriana e na evasão à imunidade inata do hospedeiro, no entanto, apesar do elevado número de estirpes de *S. agalactiae* produtoras de DNases, não é evidente o seu envolvimento na patogénese desta bactéria. O presente estudo teve como principal objectivo correlacionar a actividade das DNases com outras variáveis em estudo, tais como, genótipo da estirpe, a sua origem clínica (colonização ou infecção) e o hospedeiro (humano ou bovino), por forma a contribuir para o esclarecimento desta temática. Uma colecção de 345 estirpes de *S. agalactiae* foi caracterizada por serotipagem, MLST (“*Multilocus Sequence Typing*”) para identificação de sequências tipo (ST), perfis MLVA (“*Multiple-Locus Variant-Repeat Assay*”), padrão de resistência a antimicrobianos, elementos móveis e proteínas de superfície, padrão de restrição por PFGE (“*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”) e a actividade das DNases. As estirpes de origem bovina (n=60; 100%) e a maioria (n=285; 86%) das estirpes de origem humana foram produtoras de DNases. As estirpes não produtoras apresentaram a mesma linhagem genética: CC19 (tipos II, III-1 e V). Foram identificados dois perfis MLVA nas estirpes CC19 (perfil 32 em estirpes ST28 e perfil 33 nas restantes). Verificou-se que 31% das estirpes CC19 de colonização revelaram resistência à eritromicina e 16.4% apresentaram resistência à eritromicina e clindamicina. Nas estirpes ST28 foi identificado o elemento móvel *GBSi1* e nas restantes estirpes CC19 foi detectado o elemento móvel *IS1548*. Em todas as estirpes, excepto uma foi detectado o gene *rib*. Foram identificados cinco padrões de PFGE, concluindo-se que a maioria das estirpes era clonal. O presente estudo permitiu evidenciar que o facto de uma estirpe pertencer ao CC19 aumenta a probabilidade de não produzir DNases.

**Palavras-chave:** *Streptococcus agalactiae*, DNases extracelulares, genótipo, origem clínica, hospedeiro

# Abstract

*Streptococcus agalactiae* is the leading cause of neonatal pneumonia, sepsis and meningitis, and emerging infection disease among adults with underlying medical conditions. The DNases are very advantageous in the spread of infectious bacteria and in the evasion of host innate immunity, however, despite the large number of *S. agalactiae* strains with DNase activity, there is no evidence implicating DNases in the pathogenicity of this bacterium. The main objective of this study was to correlate the DNases activity with other variables, such as, strain genotype, its clinical origin (colonization and infection) and host (human or bovine) in order to contribute for the understanding of this matter. A collection of 345 *S. agalactiae* strains was characterized by serotyping, MLST (“*Multilocus Sequence Typing*”) to identify type sequences (ST), MLVA profiles (“*Multiple-Locus Variant-Repeat Assay*”), antibiotic resistance profiling, detection of mobile elements and surface proteins, PFGE (“*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”) restriction patterns, and the evaluation of the DNases activity. The bovine strains (n=60; 100%) and the majority of human strains (n=285; 86%) produced DNases. Strains without DNases activity showed to be of the same genetic lineage: CC19 (types II, III-1 and V). We identified two MLVA profiles for CC19 strains (profile 32 to ST28 strains and profile 33 for the others). It was found that 31% of the CC19 colonizing strains showed resistance to erythromycin and 16.4% were resistant to both erythromycin and clindamycin. The mobile element *GBSiI* was mostly found in ST28 strains whereas the mobile element *IS1548* was identified in remaining CC19 strains. All strains, except one carry the *rib* gene. We identified five PFGE restriction patterns, indicating that the majority of the strains was clonal. The present study highlights the fact that a strain belonging to the CC19 increases your probability of not producing DNases.

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, DNases, genotype, clinical origin, host

# Índice Geral

<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Anexos .....</b>	<b>xi</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Características gerais do género <i>Streptococcus</i> .....	1
1.2 Espécie <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	3
1.2.1 Enquadramento Histórico .....	3
1.2.2 Isolamento e Identificação .....	4
1.2.3 Aspectos Clínicos .....	5
1.2.4 Aspectos Epidemiológicos .....	8
1.2.4.1 Epidemiologia Molecular .....	9
1.2.5 Genómica .....	12
1.2.6 Factores de Virulência .....	14
1.2.6.1 DNases .....	17
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>21</b>
2.1 Colecção de estirpes de <i>S. agalactiae</i> .....	21
2.1.1 Estirpes de referência e clínicas de <i>S. agalactiae</i> .....	21
2.2 Propagação de <i>S. agalactiae</i> .....	25
2.3 Extracção de DNA .....	25
2.4 Purificação e sequenciação de DNA .....	25
2.5 Tipagem Capsular em <i>S. agalactiae</i> .....	26
2.6 Identificação de Linhagens Genéticas por MLST .....	27
2.7 Avaliação da actividade das DNases em estirpes de referência e clínicas .....	28

2.7.1 Ensaio qualitativo .....	28
2.7.2 Ensaio semi-quantitativo e quantitativo .....	28
2.8 Subcaracterização de estirpes não produtoras de DNases .....	29
2.8.1 MLVA.....	30
2.8.2 Suscetibilidade a antimicrobianos .....	31
2.8.3 Detecção de genes associados à resistência aos macrólidos .....	32
2.8.4 Detecção de elementos móveis ( <i>GBSi1</i> , <i>IS1548</i> ) na região intergênica <i>scpB-lmb</i> ....	32
2.8.5 Pesquisa de genes pertencentes à família de proteínas Alp .....	33
2.8.6 PFGE.....	33
2.8 Análise estatística.....	34
<b>3. Resultados .....</b>	<b>35</b>
3.1 Identificação das linhagens genéticas em cada serótipo/genótipo por MLST.....	35
3.2 Avaliação qualitativa e semi-quantitativa da actividade das DNases.....	36
3.3 Avaliação quantitativa da actividade das DNases .....	39
3.4 Subcaracterização das estirpes CC19 .....	41
3.4.1 MLVA.....	42
3.4.2 Suscetibilidade a antimicrobianos .....	42
3.4.3 Detecção de elementos móveis ( <i>GBSi1</i> , <i>IS1548</i> ) na região intergênica <i>scpB-lmb</i> ....	42
3.4.4 Pesquisa de genes pertencentes à família de proteínas Alp .....	43
3.4.5 PFGE.....	43
<b>4. Discussão .....</b>	<b>45</b>
4.1 Caracterização molecular de <i>S. agalactiae</i> .....	45
4.2 Avaliação da actividade das DNases.....	46
4.3 Subcaracterização das estirpes CC19 .....	47
4.4 Conclusões/Perspectivas Futuras .....	49
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>51</b>



# Índice de Figuras

Figura 1.1 .....	2
Figura 1.2 .....	19
Figura 2.1 .....	24
Figura 2.2 .....	32
Figura 3.1 .....	37
Figura 3.2 .....	41
Figura 3.3 .....	44

# Índice de Tabelas

Tabela 1.1 .....	17
Tabela 2.1 .....	21
Tabela 2.2 .....	22
Tabela 2.3 .....	23
Tabela 2.4 .....	30
Tabela 2.5 .....	31
Tabela 3.1 .....	37
Tabela 3.2 .....	39

# Índice de Anexos

Anexo I .....	72
Anexo II.....	75

# Lista de Abreviaturas

**AAP** - *American Academy of Pediatrics*

**ACOG**- *American College of Obstetricians and Gynecologists*

**Alp** - *Alpha-like proteins*

**CAMP** – *Christie-Atkins-Munch-Petersen*

**CC** - *Complexo Clonal*

**CDC** – *Centers for Disease Control*

**CMI** – *Concentrações Mínima Inibitória*

**CPSs**- *Type - specific capsular polysaccharides*

**DDI/URST** - *Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência de Doenças Sexualmente Transmissíveis*

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxiribonucleico

**DLV** - *Double-locus variation*

**EUA** - *Estados Unidos da América*

**FCT/UNL** - *Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa*

**erm** – *erythromycin ribosome methylation*

**h.** - horas

**ICAT/FCUL** - *Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia/ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*

**IgG** - *Imunoglobulina de tipo G*

**INSA** - *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*

**LCR** - *Líquido cefalo-raquidiano*

**mef** – *macrolide efflux*

**min.** - minutos

**MLSB** – *macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B*

**MLST** - *Multilocus Sequence Typing*

**MLVA** - *Multiple-Locus Variant-Repeat Assay*

**Nº** - Número

**NETs** - *Neutrophil Extracellular Traps*

**NT** - Não tipável

**pb** - pares de base

**PBPs** - *Penicillin-binding proteins*

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*

**PFGE** – *Pulse field gel electrophoresis*

**RNA** - *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico

**s.** - segundos

**ST** - *Sequence Type*

**SLV** - *Single-locus variation*

**UPGMA** - *Unweighted pair group method with arithmetic averages*

**VNTRs** - *Variable Number Tandem Repeat*



# 1. Introdução

## 1.1 Características gerais do género *Streptococcus*

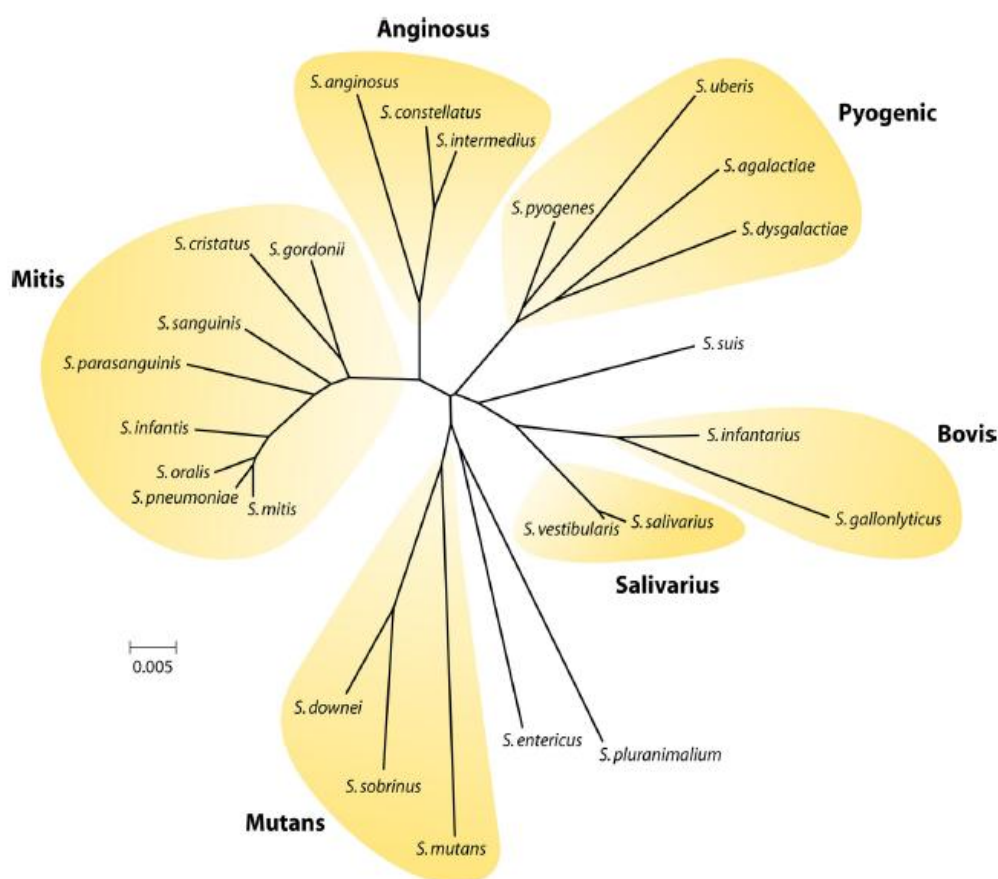
O género *Streptococcus* pertence ao filo *Firmicute*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Streptococcaceae*. Esta família também inclui os géneros *Lactococcus* e *Lactovum* (Matthies *et al.*, 2004). Actualmente, o género *Streptococcus* compreende 100 espécies e 17 subespécies, as quais estão distribuídas em linhagens de origem animal e humana (Garrity, 2008; Noobs *et al.*, 2009).

A designação *Streptococcus* vem do grego *strepto* (curvo) e *coccus* (esférico). Os microorganismos do género *Streptococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, imóveis, não formam esporos e apresentam-se frequentemente em pares ou cadeia e podem apresentar cápsula. São anaeróbias facultativas, com capacidade de propagação na presença de oxigénio, sendo, no entanto, desprovidas de metabolismo respiratório (quimiotróficos), uma vez que não são capazes de utilizar a cadeia transportadora de electrões. Desta forma, algumas espécies requerem atmosfera de CO<sub>2</sub> para o seu isolamento inicial (Henry, 1996). São bactérias nutritivamente exigentes, observando-se melhores taxas de crescimento em meios enriquecidos com sangue. Do ponto de vista morfológico, têm uma aparência esférica/ovóide e com dimensões compreendidas entre 0,5 e 2 µm de diâmetro. Crescem a temperaturas compreendidas entre os 25 e os 45°C, no entanto, a sua temperatura óptima de crescimento encontra-se compreendida entre 35 e 37°C (Holt *et al.*, 1994; Brock *et al.*, 2010).

A definição de espécies nos microorganismos do género *Streptococcus* foi desde sempre motivo de controvérsia, dado o sistema de classificação em vigor ter por base um número limitado de características de avaliação complexas, tais como, tamanho das colónias, hemólise e grupo de hidratos de carbono envolvido no metabolismo (Facklam, 2002). Existem outras formas de classificação destes microorganismos, baseadas em aspectos fisiológicos (piogénicos, viridans, lácticos e enterocócicos), serológicos (grupos de Lancefield) ou na reacção hemolítica das bactérias quando crescem em meio suplementado com sangue (Henry, 1996). A classificação de Lancefield, método que foi descrito por Rebecca Lancefield em 1933 (Lancefield, 1933), baseia-se na utilização de testes de precipitação, permitindo a discriminação do género *Streptococcus* em vários grupos: A, B, C, D e E. Estudos posteriores demonstraram a existência de outros grupos, denominados por F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V. Actualmente, os testes serológicos de Lancefield, por aglutinação com anticorpos específicos ligados a partículas látex são bastante utilizados para uma confirmação rápida do grupo ao qual pertence o estreptococo β-hemolítico em identificação (Shanson *et al.*, 2000). Em microbiologia clínica, a reacção hemolítica é uma característica fenotípica frequentemente utilizada na identificação de espécies pertencentes ao género *Streptococcus*. Existem estirpes com capacidade de provocar hemólise completa dos glóbulos vermelhos, sendo facilmente observável a descoloração do meio em

torno das colónias bacterianas (hemólise completa ou  $\beta$ -hemólise) e estirpes que apenas causam a destruição parcial dos glóbulos vermelhos (hemólise parcial ou  $\alpha$ -hemólise), com formação de um halo esverdeado em torno das colónias bacterianas. A ausência de hemólise pode igualmente ocorrer, sendo designada por  $\gamma$ -hemólise (Facklam, 1995, 2002; Henry, 1996; Shanson *et al.*, 2000; Spellerberg e Brandt, 2007).

As espécies do género *Streptococcus* com relevância clínica podem ser agrupadas de acordo com a similaridade do gene 16S rRNA (Kilian, 2005; Spellerberg e Brandt, 2007), tendo sido definidos dois grandes grupos: estreptococos piogénicos (onde se insere *S. agalactiae*) e estreptococos não piogénicos (ou do grupo viridans); este último grupo pode ainda ser subdividido em: (1) estreptococos do grupo *S. mitis*, que inclui *Streptococcus pneumoniae*; (2) estreptococos do grupo *S. anginosus*; (3) estreptococos do grupo *S. mutans*; (4) estreptococos do grupo *S. bovis*; e (5) estreptococos do grupo *S. salivarius* (Brock *et al.*, 2010; Noobs *et al.*, 2009; Spellerberg e Brandt, 2007) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Árvore taxonómica do género *Streptococcus* baseada na sequência do gene 16S rRNA (adaptado de Noobs *et al.*, 2009). Algumas espécies não foram incluídas de forma a simplificar a figura.

Os estreptococos têm sido associados ao comensalismo ou ao parasitismo, não só no Homem como noutros hospedeiros. A relação bactéria-hospedeiro-ambiente constitui um dos mais interessantes motivos de estudo dos estreptococos, uma vez que se tem observado que estas bactérias podem transitar de um estadio de colonização para o de agente causal de infecção, e ser mesmo responsáveis por patologias eventualmente mortais (Brock *et al.*, 2010).

## 1.2 Espécie *Streptococcus agalactiae*

### 1.2.1 Enquadramento Histórico

*Streptococcus agalactiae* foi descrito pela primeira vez em 1887, por Nocard e Mollereau, como agente patogénico da mastite bovina, tendo sido designado por *Streptococcus de la mammitis* (Blowey e Edmondson, 1995). Desde então, a classificação taxonómica da espécie sofreu diversas alterações, até que em 1896, Lehmann e Neumann lhe atribuíram a sua actual designação, *Streptococcus agalactiae* (Buchanan e Gibbons, 1974). Este microorganismo foi primeiramente identificado como agente etiológico da mastite bovina, tendo sido considerado um agente patogénico de contágio (Blowey e Edmondson, 1995). Desde a sua descrição, em 1887, *S. agalactiae* também apareceu associado a doenças em outros animais como ovelhas, cabras, suínos, caninos, felinos, roedores, rãs e peixes (Elliott *et al.*, 1990; Lammler *et al.*, 1998). Por volta de 1930, este microorganismo foi pela primeira vez associado a casos de colonização e infecção em humanos. A colonização por *S. agalactiae* foi estabelecida com base na observação de culturas positivas a partir de secreções vaginais de mulheres assintomáticas (Lancefield e Hare, 1935) e os casos de infecção terão sido originalmente associados a septicémia puerperal e bacterémia por *S. agalactiae* (Fry, 1938; Rantz e Kirby, 1942).

Nas décadas de 1960 e 1970, *S. agalactiae* surgiu como agente etiológico de doença neonatal, tendo sido mesmo considerado como a principal causa de morbilidade e mortalidade em recém-nascidos nos Estados Unidos da América (EUA) (Baker *et al.*, 1973; Barton *et al.*, 1973; Franciosi *et al.*, 1973; Mccracken, 1973), o que justificou a realização de diversos estudos, nomeadamente no âmbito da investigação epidemiológica, clínica e microbiológica. Em 1996, a comunidade científica representada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) e a *American Academy of Pediatrics* (AAP) publicou pela primeira vez as directrizes de prevenção da doença perinatal causada por *S. agalactiae*, as quais têm vindo a ser regularmente reformuladas e que actualmente constituem um instrumento indispensável para prática clínica (CDC, 2010).



## 1.2.2 Isolamento e Identificação

Os microorganismos pertencentes à espécie *Streptococcus agalactiae* inserem-se no grupo dos estreptococos piogénicos (Figura 1.1), são Gram-positivos, catalase negativos e constituem a única espécie do género *Streptococcus* que apresenta o carbohidrato antigénico de superfície do grupo B (Strahl *et al.*, 2001). A variação estrutural de *S. agalactiae* não se resume somente ao antigénio do grupo específico B, existindo outro complexo polissacárido localizado na região externa à parede celular que representa a cápsula. Assim, Rebeca Lancefield definiu dois antigénios da parede celular em *S. agalactiae*: o antigénio específico do grupo B, comum a todas as estirpes e responsável pela atribuição da designação de *Streptococcus* do Grupo B (GBS, de “Group B *Streptococcus*”); e o antigénio capsular responsável pela atribuição dos tipos capsulares conhecidos actualmente para *S. agalactiae* (Caliot *et al.*, 2012; Lancefield, 1933, 1934; Lancefield e Hare, 1935).

Tal como outras bactérias Gram-positivas, *S. agalactiae* apresenta uma parede celular espessa sob um arranjo complexo de cadeias constituídas por peptidoglicano, hidratos de carbono, ácido teicóico, lipoteicóico e proteínas (Koneman *et al.*, 2005). O antigénio específico do grupo B consiste num carbohidrato ancorado ao peptidoglicano, sendo que esta estrutura complexa se baseia no arranjo de quatro oligossacáridos distintos (ramnose, galactose, N-acetilglucosamina e glucitol) (Michon *et al.*, 1987, 1988). Recentemente foi descrito que o polissacárido capsular e o carbohidrato do grupo B ligam-se por covalência a estruturas distintas do peptidoglicano, como a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico, respectivamente (Deng *et al.*, 2000).

Com base nas variações da estrutura e composição dos polissacáridos capsulares (CPSs de “type-specific capsular polysaccharides”) e nas respostas imunológicas distintas estão actualmente descritos dez tipos distintos para *S. agalactiae*: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX (Jennings *et al.*, 1981, 1983a, 1983b; Kogan *et al.*, 1995, 1996; Lancefield, 1933; Lancefield e Hare, 1935; Slotved *et al.*, 2007; Von Hunolstein *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1987, 1989, 1991).

Existem diversos métodos de identificação de *S. agalactiae*. Geralmente, procede-se à avaliação morfológica das suas colónias, bem como, à identificação do tipo de hemólise visível após cultura em gelose de sangue. A grande maioria das estirpes apresenta  $\beta$ -hemólise discreta em redor das colónias, no entanto, também existem estirpes  $\alpha$ -hemolíticas e  $\gamma$ -hemolíticas (Facklam, 2002; Spellerberg e Brandt, 2007). Apesar da importância da avaliação morfológica, a identificação presuntiva da espécie *S. agalactiae* baseia-se igualmente nas características microscópicas após coloração de Gram (diplococos de coloração Gram-positiva) e no teste catalase negativo.

A identificação/confirmação da espécie *S. agalactiae* pode ser realizada com base em testes serológicos, que se baseiam na detecção do carbohidrato do grupo B de Lancefield, tal como já descrito anteriormente, os quais se baseiam na utilização de anticorpos específicos ligados a partículas látex que permitem visualizar aglutinação por reconhecimento do antigénio do referido grupo. Desta

forma, estes testes são bastante utilizados para uma confirmação rápida do estreptococo  $\beta$ -hemolítico através da identificação do grupo ao qual pertence (Spellerberg e Brandt, 2007).

### 1.2.3 Aspectos Clínicos

*S. agalactiae* é uma bactéria considerada comensal dos tractos gastrointestinal, respiratório e urogenital, tendo como hospedeiros preferenciais humanos e bovinos. Este microorganismo constitui a principal causa mundial de infecções invasivas no período perinatal e neonatal, causando quadros graves de septicémia, pneumonia, meningite e endocardite no recém-nascido devido à transmissão vertical (Lindahl *et al.*, 2005; Schuchat, 1998, 2000),

É considerado um importante agente patogénico em parturientes, uma vez que pode contribuir para o aborto, prematuridade, infecção do trato urinário, corioamnionite e endometrite puerperal (Gibbs *et al.*, 2004; Lindahl *et al.*, 2005). Este microorganismo tem sido associado a infecções emergentes na população adulta, nomeadamente em indivíduos imunocomprometidos ou com alguma patologia associada, como diabetes *mellitus*, neoplasias malignas, doença hepática, danos neurológicos, alcoolismo e infecção por VIH. A gama de infecções neste grupo populacional inclui infecções de pele e tecidos moles, bacteriémia sem foco definido, infecção do trato genital e urinário, pneumonia, peritonite, meningite, endocardite, osteomielite, artrite séptica e infecções das extremidades em diabéticos (Farley, 2001; Henry, 1996; Phares *et al.*, 2008). Contudo, na maioria dos casos, *S. agalactiae* surge associado apenas à colonização, a qual pode ser transitória, crónica ou intermitente.

As infecções neonatais por *S. agalactiae* constituem a principal preocupação clínica e podem ser classificadas em infecção de início precoce e infecção de início tardio, consoante a idade da criança no momento da manifestação clínica, diferindo quanto à apresentação clínica, prognóstico, características epidemiológicas e patogénese. A infecção de início precoce (idade < 7 dias) é a mais comum, representando cerca de 80% de todos os casos de infecção e é caracterizada pelo aparecimento de sintomatologia (dificuldade respiratória, febre, hipotensão e icterícia) nas primeiras 6 horas de vida, e encontra-se associada a uma mortalidade de cerca de 15 a 20%. A infecção pode ocorrer durante a passagem do recém-nascido pelo canal vaginal materno, colonizado por *S. agalactiae*, ou por infecção ascendente, pelo tracto genital, com contaminação do líquido amniótico, aquando da ruptura das membranas fetais. No líquido amniótico, o microorganismo multiplica-se e cloniza o tracto respiratório do feto, podendo causar pneumonia, e disseminar-se através da corrente sanguínea, até outros locais anatómicos, resultando em quadros clínicos como meningite e osteomielite (Farley *et al.*, 1993; Lindahl *et al.*, 2005; Rubens *et al.*, 1991).

A infecção de início tardio ( $7 \leq \text{idade} \leq 89$ ) ocorre em média aos 24 dias de idade, com predomínio dos quadros clínicos de meningite e septicémia (Gibbs *et al.*, 2004; Graça, 2005). A sua

patogénese é pouco conhecida; no entanto supõe-se que tanto a transmissão vertical (materno-infantil) como a horizontal (por exemplo: profissionais de saúde) sejam prováveis focos desta infecção (Lindahl *et al.*, 2005), a qual tem sido associada a uma menor taxa de mortalidade (2 a 6%) relativamente à infecção de início precoce, mas está associada a alta morbilidade, visto que 25 a 50% dos sobreviventes desenvolvem sequelas neurológicas permanentes, tais como, cegueira, surdez, e hidrocefalia (Turow, 2000).

Existem alguns factores de risco maternos que aumentam a probabilidade de transmissão ao recém-nascido, tais como a colonização por *S. agalactiae* entre as 35 e 37 semanas de gestação, a prematuridade (inferior a 37 semanas), história clínica anterior de filho com doença invasiva por *S. agalactiae*, ruptura prolongada de membranas antes do parto (superior a 18 horas), febre intraparto igual ou superior a 38°C e bacteriúria por *S. agalactiae* durante a gestação (CDC, 1996; Gibbs *et al.*, 2004; Lindahl *et al.*, 2005).

A maioria das infecções neonatais por *S. agalactiae* pode ser prevenida através da profilaxia antimicrobiana intraparto. Estudos realizados por Schrag e colaboradores (Schrag *et al.*, 2000), demonstram um declínio acentuado (70%) das infecções neonatais de início precoce nos EUA devido à utilização generalizada da profilaxia antimicrobiana intraparto. De acordo com as actuais directrizes de prevenção do CDC (CDC, 2010), o rastreio de *S. agalactiae* deve ser realizado na região vagino-perianal, entre as 35 a 37 semanas de gestação, por cultura, sendo recomendado o tratamento profilático intraparto de todas as parturientes colonizadas por *S. agalactiae*. A antibioterapia deve ser efectuada por via parenteral no início do trabalho de parto ou aquando da ruptura das membranas. A antibioterapia profilática é ainda indicada para casos de cultura de *S. agalactiae* negativa, sempre que ocorra ruptura prematura das membranas, uma vez que permite a eliminação total ou parcial de bactérias prevenindo o desenvolvimento de processos infecciosos pela mãe e recém-nascido (Glass *et al.*, 2005; Schuchat, 1996), bem como para casos de parto prematuro, ou de parturientes não rastreadas durante a gravidez, devido ao risco aumentado de doença neonatal por *S. agalactiae* (Schrag *et al.*, 2002).

A penicilina continua a ser o antibiótico de primeira escolha para a profilaxia antimicrobiana intraparto, uma vez que é eficaz na passagem transplacentária, apresenta um largo espectro de acção direccionado aos Gram-positivos, não foram encontrados casos de microrganismos resistentes e apresenta um custo reduzido. Nos casos de parturientes alérgicas à penicilina, a ampicilina ou a cefazolina surgem como alternativas de primeira linha. Como antibióticos de segunda linha são recomendados a vancomicina, a eritromicina ou a clindamicina (CDC, 2002). Foram, entretanto isoladas algumas estirpes de *S. agalactiae* com sensibilidade reduzida à penicilina nos EUA e no Japão (Chu *et al.*, 2007; Dahesh *et al.*, 2008; Negano *et al.*, 2008). Este fenómeno tem sido atribuído à ocorrência de mutações nos genes que codificam as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), alvo dos antibióticos beta-lactâmicos, as quais contribuíram para o aparecimento de concentrações mínimas inibitórias (CMI) elevadas. No entanto, análises de filogenia comparativa demonstraram a inexistência

de linhagens epidêmicas com sensibilidade reduzida à penicilina, e indicaram que estas linhagens têm ocorrido de forma independente por mutações cumulativas nos genes *pbp*, mais especificamente ao nível do gene que codifica a Pbp2x (Nagano *et al.*, 2008). Estes dados alertam para a necessidade de realização de vigilância eficaz, bem como para a necessidade de detecção de novos marcadores de resistência, até porque, vários estudos em *S. agalactiae* demonstraram a ocorrência de estirpes não susceptíveis a outros agentes antimicrobianos, tais como: eritromicina, clindamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e fluoroquinolonas, em taxas de prevalência variáveis, de acordo com a região geográfica (Gonzalez e Andreu, 2005; Wehbeh *et al.*, 2005). A resistência aos macrólidos (i.e. eritromicina) e às lincosamidas (i.e. clindamicina), em *S. agalactiae* está associada à modificação do alvo ribossomal por metilação (mecanismo mais frequente) e ao efluxo activo da droga. A metilação da região 23S rRNA é mediada por uma metilase ribossomal [codificada pelos genes *erm* (“*erythromycin ribosome methylation*”) (Seppala *et al.*, 1998; Weisblum, 1995)], a qual adiciona dois grupos metil a um resíduo de adenina do 23S rRNA, provocando alterações configuracionais no ribossoma e, consequentemente, uma diminuição da ligação dos macrólidos, das lincosamidas e das estreptograminas B; este fenótipo de resistência é denominado MLSB (macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B). A produção da metilase pode ser constitutiva, quando é naturalmente produzida pela própria célula, correspondendo ao fenótipo cMLSB associado ao genótipo *erm*(B); ou indutiva sempre que é necessário um antibiótico para induzir a sua expressão, sendo por isso designado por fenótipo iMLSB associado ao genótipo *erm*(A). Este segundo mecanismo baseia-se no efluxo activo da droga resultante da síntese de uma bomba de efluxo dependente de energia, sendo mediado pela proteína Mef(E), codificada pelo gene *mef*(E) (“*macrolide efflux*”), que apenas confere resistência aos macrólidos, pelo que se denomina por fenótipo M (Leclercq, 2002; Rosato *et al.*, 1999; Seppala *et al.*, 1998). A resistência à eritromicina e clindamicina estima-se entre 10 a 30% na Europa e EUA (de Azavedo *et al.*, 2001; Farley, 2001; Fitoussi *et al.*, 2001; Florindo *et al.*, 2010; Gherardi *et al.*, 2007; Gygax *et al.*, 2006; Phares *et al.*, 2008); no entanto, em regiões como Taiwan, a resistência à eritromicina e à clindamicina atinge valores bastante mais elevados, na ordem dos 91% e 82%, respectivamente. Desta forma, a realização de estudos de resistência a estes antibióticos é de extrema importância, uma vez que são frequentemente administrados como alternativa para parturientes alérgicas à penicilina. A vancomicina pode constituir uma alternativa à penicilina; no entanto, a sua utilização deve manter-se restrita a ambiente hospitalar dada a sua toxicidade e resistências emergentes descritas para este antibiótico noutros organismos Gram-positivos (Schrag *et al.*, 2002).

No que diz respeito aos bovinos, este microorganismo é considerado como agente etiológico da mastite bovina (Seegers *et al.*, 2003). As mastites são infecções intra-mamárias, de um ou mais quartos do úbere da vaca, com inflamação ao nível da glândula mamária e alterações da quantidade, aspecto e composição de leite produzido. A via de entrada dos agentes patogénicos ocorre pelo canal do teto, onde se multiplicam, levando à degradação dos tecidos celulares, sendo que a destruição total

ou parcial do epitélio secretor leva à diminuição da produção de leite. A mastite pode ser classificada como subclínica ou clínica. A forma subclínica não é detectada visualmente, uma vez que o leite permanece inalterado e o úbere não apresenta sintomas visíveis de doença. No entanto, a sua detecção pode ser realizada pela contagem de células leucocitárias presentes no leite, pois a resposta inflamatória devido à infecção promove um aumento nas contagens de células leucocitárias. A forma clínica é caracterizada por sintomas visíveis, nomeadamente alteração da cor e textura do leite, úbere avermelhado, quente e doloroso, bem como febre e falta de apetite do animal afectado (Seegers *et al.*, 2003). Embora a mastite subclínica, seja menos grave fisiologicamente, esta é mais frequente e representa um maior risco de contaminação para outros animais, uma vez que a sua detecção é difícil. Desta forma, apesar de as formas subclínicas serem menos evidentes para o produtor, são as que mais afectam o rendimento económico da exploração leiteira. A maior parte dos antimicrobianos utilizados em caso de mastites bovinas, são dirigidos a bactérias Gram-positivas, particularmente *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*. Os  $\beta$ -lactâmicos constituem os antimicrobianos de primeira escolha em profilaxia e tratamento, uma vez que a resistência a estes antimicrobianos não tem sido observada, enquanto que os macrólidos são antimicrobianos recomendados como de segunda escolha (Schuchat, 2001).

## 1.2.4 Aspectos Epidemiológicos

Estima-se que a colonização da mucosa anogenital de mulheres saudáveis por *S. agalactiae* ronda os 25 a 40% (Schuchat, 1999), sendo o desenvolvimento de estratégias de prevenção fundamental. Estes dados levaram à realização de diversos estudos com o intuito de desenvolver estratégias de prevenção. Em 1996, o CDC publicou as primeiras directrizes de prevenção, culminando na implementação de profilaxia antibiótica intraparto nos EUA e Austrália, o que levou a uma diminuição significativa do número de infecções em recém-nascidos (Berner *et al.*, 1998; Schuchat *et al.*, 1998). De facto, a incidência da doença de início precoce nos EUA diminuiu aproximadamente 70% [1,7 casos por 1000 nascimentos em 1993 para 0,6 casos por 1000 nascimentos em 1998 (Schrag *et al.*, 2000)], porém, não se verificou qualquer impacto na diminuição da taxa da doença de início tardio (CDC, 2005; Poyart *et al.*, 2008). Em 2002 ocorre a implementação de novas directrizes pelo CDC, nomeadamente um novo algoritmo para doentes alérgicos à penicilina e práticas específicas para determinados cenários clínicos e a incidência voltou a baixar [0,34 casos por 1000 nascimentos em 2003-2005 (Gibbs *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2003; Phares *et al.*, 2008)]. A generalização da terapêutica intraparto pode ser problemática, uma vez que tem sido acompanhada por um aumento da incidência de sepsis de início precoce causada por *Escherichia coli* (Stoll *et al.*, 2002). De forma a contornar esta situação e, a longo prazo, atingir números ainda mais reduzidos para a incidência de infecção por *S. agalactiae*, alguns autores continuam a defender a necessidade da criação

de uma vacina (Eschenbach, 2002; Maione *et al.*, 2005). O risco de infecção neonatal por *S. agalactiae* parece ser inversamente proporcional ao título de anticorpos maternos específicos para os antígenos polissacáridos desta bactéria, o que se justifica pela transferência de imunoglobulinas G (IgG) maternas através da placenta (Maione *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005). Assim sendo, a criação de uma vacina para *S. agalactiae* apresenta-se como uma estratégia preventiva promissora, sendo para tal necessário um melhor conhecimento das características antigénicas e fenotípicas das estirpes circulantes (Maione *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2005).

#### 1.2.4.1 Epidemiologia Molecular

A discriminação de estirpes associadas à colonização ou à infecção por *S. agalactiae*, com o intuito de proceder à identificação de reservatórios, vias de transmissão de agentes patogénicos, determinantes de virulência e de resistência a antimicrobianos, bem como desenho de vacinas (Kong *et al.*, 2002; Struelens *et al.*, 1996) exige a utilização de diversas técnicas que permitam uma melhor caracterização dos microorganismos.

A caracterização fenotípica tem por base as características observáveis de um organismo; no entanto, as técnicas moleculares dão a conhecer outros dados sobre a epidemiologia dos microorganismos. Desta forma, a tipagem de microorganismos com base em análises de DNA tem-se intensificado, mostrando que esta macromolécula é um potencial marcador para a diferenciação entre linhagens microbianas (Foxman *et al.*, 2005).

A discriminação das estirpes de *S. agalactiae* tem sido realizada com base na identificação do tipo capsular através de metodologias serológicas, tais como imuno-precipitação (Wilkinson e Moody, 1969), ensaios imuno-enzimáticos (Holm e Hakansson, 1988), coaglutinação (Hakansson *et al.*, 1992), imuno-electroforese por precipitação capilar (Triscott e Davis, 1979), testes de aglutinação com partículas látex (Zuerlein *et al.*, 1991) ou microscopia de fluorescência (Cropp *et al.*, 1974), entre outras. No entanto, as técnicas serológicas são laboriosas, requerem a disponibilidade de quantidades elevadas de anti-soros específicos e nem sempre permitem identificar o tipo (estirpes não tipáveis). De acordo com um estudo realizado nos EUA, cerca de 2,9% das estirpes de colonização e 1,4% das estirpes invasivas mostraram-se não tipáveis (Benson *et al.*, 2002). Estudos realizados noutras regiões geográficas como o México (12%), Canadá (13%) e Nova Zelândia (8,7%), apresentaram diferentes proporções de amostras não tipáveis (Kong *et al.*, 2002; Palacios *et al.*, 1997; Tyrrell *et al.*, 2000), revelando que a diversidade das linhagens de *S. agalactiae* está aliada à sua origem geográfica.

Amostras não tipáveis de *S. agalactiae* pelo método convencional (serologia) podem ser identificadas por métodos moleculares, nomeadamente por análise do polimorfismo dos *loci* capsulares *cps*, que codificam a estrutura do polissacárido capsular específico (CPSs de “*type-specific capsular polysaccharides*”). A serotipagem *cps*, descrita pela primeira vez por Kong e co-autores

(Kong *et al.*, 2002) tem uma concordância total com os resultados da serotipagem capsular clássica, permitindo a identificação de subtipos capsulares, nomeadamente para o tipo III, o qual compreende quatro subtipos: III-1, III-2, III-3 e III-4. Métodos moleculares de tipagem são teoricamente atraentes devido ao seu elevado poder discriminatório e reprodutibilidade (Kong *et al.*, 2002; Sellin *et al.*, 2000). Porém, algumas estirpes não são passíveis de tipagem capsular, quer por serologia, quer por genotipagem capsular. Publicações recentes sugerem que o fenótipo/genótipo não tipável pode surgir por mutações ou inserções na região variável dos *loci* capsulares *cps* (Kong *et al.*, 2008; Sellin *et al.*, 2000) ou por recombinação génica (Ramaswamy *et al.*, 2006) com consequente diminuição da síntese dos polissacáridos capsulares ou mesmo a ausência de cápsula (Palacios *et al.*, 1997).

A identificação dos tipos de *S. agalactiae* tem sido relevante para a investigação epidemiológica, pelo facto da sua distribuição variar de acordo com a região geográfica, origem étnica, patologia desenvolvida e perfil de resistência aos antimicrobianos. Estudos realizados na Europa e EUA em parturientes colonizadas por *S. agalactiae* revelaram os tipos Ia, II, III e V como os mais prevalentes (80-90%), enquanto os tipos IV, VI, VII e VIII raramente têm sido observados (Brimil, 2006; Florindo *et al.*, 2010; Hickman *et al.*, 1999). Outros países revelaram frequências diferentes sendo, por exemplo, os tipos VI, VII e VIII comuns no Japão (Lachenauer *et al.*, 1999), e o tipo IV o mais prevalente (26.3%) nos Emirados Árabes Unidos (Amin *et al.*, 2002). A evolução dos tipos capsulares parece ser contínua; de facto, durante os últimos anos, tem-se vindo a constatar a emergência do tipo V, o qual tem vindo a ser cada vez mais prevalente. Curiosamente, e igualmente importante salientar tem sido a emergência do tipo IV nos EUA, o qual passou de uma prevalência compreendida ente 0.4 e 0.6% para 8.4% (Diedrick *et al.*, 2010). Estes aspectos reflectem a ocorrência de alterações epidemiológicas, as quais advêm da variação das estirpes circulantes ao longo do tempo, e a consequente necessidade de vigilância contínua das infecções por *S. agalactiae* (Blumberg *et al.*, 1996; Brimil, 2006).

Os tipos capsulares Ia, II, III e V têm sido frequentemente associados a doença neonatal invasiva (Bohnsack *et al.*, 2008; Poyart *et al.*, 2008), bem como a doenças causadas por *S. agalactiae* na população adulta (Dogan *et al.*, 2005; Farley, 2001; Luan *et al.*, 2005). Estudos epidemiológicos, em doença neonatal invasiva, realizados na Europa e EUA apontam os tipos Ia, II, III e V como os mais prevalentes ( $\geq 82.6\%$ ). No entanto, na Europa, o tipo III surge como o mais frequente (40.6% - 74%) (Bergseng *et al.*, 2009; Imperi *et al.*, 2011; Kunze *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2007; Poyart *et al.*, 2008), enquanto nos EUA, o tipo mais predominante é o Ia (27 – 40.3%) (Bohnsack *et al.*, 2008; Phares *et al.*, 2008). Apesar de *S. agalactiae* constituir a principal causa mundial de infecção neonatal, cerca de 80% das infecções invasivas são observadas em indivíduos com idade superior a 18 anos. Na população adulta, os tipos Ia, III e V são os mais prevalentes na Europa, EUA e África ( $\geq 81\%$ ), sendo encontrados em proporções idênticas para as referidas regiões geográficas (Farley, 2001; Huber *et al.*, 2011; Lambertsens *et al.*, 2010; Skoff *et al.*, 2009; Tazi *et al.*, 2011).

A associação do tipo III a casos de infecção neonatal, nomeadamente quadros graves de meningite (Gherardi *et al.*, 2007; Imperi *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2003; Kunze *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2007; Tazi *et al.*, 2010) justificou a realização de diversos estudos (Bohnsack *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2006) com o intuito de obter uma melhor caracterização do mesmo. O subtipo III-2 é geralmente responsável pelas infecções neonatais, sendo crucial a vigilância epidemiológica das linhagens genéticas que expressam este tipo, enquanto que subtipo III-1 encontra-se predominantemente relacionado com a colonização (Gherardi *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2009; Tazi *et al.*, 2010).

Para além da análise capsular, a análise de macrorestrição de fragmentos de DNA separados por Electroforese em Campo Pulsado (PFGE, “*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”) e a análise de sequências de múltiplos *loci* (MLST, “*Multilocus Sequence Typing*”) têm sido utilizadas para a caracterização molecular das estirpes de *S. agalactiae* permitindo definir estruturas populacionais através da identificação da relação genotípica, clonalidade e linhagens genéticas (Jones *et al.*, 2003; Melles *et al.*, 2007; Tenover *et al.*, 1995). A técnica de PFGE é bastante discriminatória permitindo a avaliação da relação genotípica ou clonalidade entre as estirpes em estudo, a qual se baseia na utilização de enzimas de restrição que reconhecem sequências pouco frequentes no DNA cromossomal, dando origem a fragmentos de peso molecular elevado, os quais são posteriormente separados por um sistema de electroforese em campo pulsado (Rato *et al.*, 2008; Tenover *et al.*, 1995). Dados publicados demonstraram a importância desta técnica na distinção entre estirpes de colonização e infecção, sendo que as últimas apresentam um perfil de PFGE semelhante, o que foi considerado indicativo de clonalidade (Fluegge *et al.*, 2011).

A análise por MLST tem sido utilizada como método padrão para a determinação da dinâmica da estrutura genética das populações bacterianas a uma escala global e, consequentemente tem sido igualmente aplicada à epidemiologia molecular das infecções por *S. agalactiae* (Cieslewicz *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2003, 2006; Luan *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006), tendo permitido a identificação de duas linhagens genéticas associadas ao tipo capsular III. Desta forma, foi possível concluir que as estirpes respeitantes ao clone hipervirulento com sequência-tipo 17 (*sequence type* 17, ST17), pertencem ao subtipo capsular III-2, o qual é responsável pela grande maioria das infecções neonatais, enquanto que o ST19, pertence ao subtipo III-1, o qual se encontra predominantemente associado a casos de colonização (Fluegge *et al.*, 2011; Gherardi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Tazi *et al.*, 2010).

Apesar da serotipagem capsular, MLST e PFGE serem as principais técnicas de eleição para a caracterização molecular das estirpes de *S. agalactiae*, a análise de sequências de múltiplos *loci* com número variável de repetições (MLVA, *Multiple-Locus Variant-Repeat Assay*), descrita recentemente para esta bactéria (Haguenoer *et al.*, 2011), tem surgido como uma ferramenta valiosa para a distinção de estirpes, sendo um método complementar às referidas metodologias. Análises de genomas bacterianos sequenciados têm revelado a existência de sequências com número variável de repetições



em *tandem* (VNTRs, *Variable Number Tandem Repeat*), as quais podem exibir polimorfismo intra-espécie e são variáveis em tamanho, localização e tipo de repetição (Lindstedt, 2005). A variação do número de repetições em determinados *loci* sugere a sua implicação na adaptação genómica e fenotípica das bactérias ao ambiente no qual se encontram inseridas (Martin *et al.*, 2003). Através da análise do polimorfismo das repetições em *tandem* nos diversos *loci*, a técnica MLVA tem como alvo diversos marcadores génicos (genes envolvidos no metabolismo, genes associados à virulência e ilhas genómicas) (Tettelin *et al.*, 2005), sendo aplicada com sucesso a diversas espécies bacterianas devido ao seu elevado poder discriminatório, possibilitando a obtenção de uma distribuição clonal das estirpes e a distinção entre isolados pertencentes a linhagens homogêneas (Haguenoer *et al.*, 2011; Pourcel *et al.*, 2009; Puopolo e Madoff, 2003).

### 1.2.5 Genómica

A análise genómica de *S. agalactiae* demonstrou que cada cromossoma constitui um mosaico de diferentes fragmentos ancestrais, sugerindo que o intercâmbio de fragmentos de DNA tem contribuído para a dinâmica evolutiva do genoma. De facto, pensa-se que os complexos clonais com importância clínica terão derivado de um único clone, o qual terá evoluído através da troca de grandes regiões cromossómicas com microorganismos de linhagens mais distantes (Bisharat *et al.*, 2004; Brochet *et al.*, 2006; Rice *et al.*, 2007).

A avaliação da variabilidade genética em *S. agalactiae*, só foi possível desde que Tettelin, Glaser e co-autores (Glaser *et al.*, 2002; Tettelin *et al.*, 2002, 2005) procederam à sequenciação do genoma completo das estirpes de referência de *S. agalactiae*, nomeadamente a 2603V/R (V/ST110), a NEM316 (III/ST23) e a COH1 (III/ST17), cujo tamanho dos genomas sequenciados é de 2.160.267, 2.211.485 e 2.235.585 pares de bases (pb), respectivamente. Cada genoma revelou um número diferente de genes, assim, a estirpe 2603V/R apresenta 2169 genes, a estirpe NEM316 possui 2118 genes e a estirpe COH1 contém 2481 genes. A percentagem de G-C também foi diferente entre as estirpes, sendo de 35.6% nas duas primeiras e de 35.3% em COH1 (Glaser *et al.*, 2002; Tettelin *et al.*, 2002, 2005).

A análise dos genomas das estirpes de referência de *S. agalactiae* demonstrou a existência de um “*pan-genome*”, constituído por genes partilhados por todas as estirpes (“*core-genome*”) que no seu conjunto representam cerca de 80% do genoma total, e por um “*accessory genome*”, constituído por genes específicos/exclusivos de cada estirpe. A variação genética ocorre sobretudo neste último, com consequências ao nível das propriedades biológicas que poderão contribuir para a adaptação das estirpes a nichos ecológicos específicos, bem como para a patogénese (Tettelin *et al.*, 2005). O reservatório genético de *S. agalactiae* parece ser muito vasto (“*open pan-genome*”), já que novos genes são sucessivamente identificados, média de 33 genes por genoma sequenciado, mesmo após a

sequenciação de oito genomas de *S. agalactiae* de origem humana (Tettelin *et al.*, 2005). A comparação de genomas das estirpes de *S. agalactiae* que infectam especificamente o Homem com o único genoma de origem bovina até agora sequenciado (Richards *et al.*, 2011), demonstrou a existência de 183 genes específicos/exclusivos da estirpe bovina. Desta forma, a análise multigenómica é essencial para a caracterização funcional de importantes determinantes génicos de forma a auxiliar a compreensão da complexidade das espécies bacterianas (Lauer *et al.*, 2005).

O DNA exógeno, adquirido por mecanismos genéticos de transferência horizontal desempenha um importante papel na virulência, evolução e diversificação genómica dos microorganismos do género *Streptococcus* (Brussow *et al.*, 2004; Canchaya *et al.*, 2002). De facto, vários estudos evidenciam a transferência genética horizontal em *S. agalactiae* envolvendo elementos móveis (i.e. bacteriófagos, transposões, e sequências de inserção), uma observação que corrobora a aquisição de características provenientes de outras espécies bacterianas.

A heterogeneidade genética entre estirpes de *S. agalactiae*, mesmo quando pertencentes ao mesmo tipo, sugere que mecanismos de aquisição, duplicação e rearranjo contribuíram para a diversidade genética das espécies e para a adaptação de *S. agalactiae* a novos nichos ambientais, auxiliando a emergência desta bactéria como importante agente patogénico (Tettelin *et al.*, 2002). Os genes adquiridos estão na sua maioria relacionados com o metabolismo ou têm funções de adesinas, invasinas, superantígenos e determinantes de resistência a antibióticos. Tais genes têm tendência a localizar-se em regiões cromossómicas do “*accessory genome*” designadas por ilhas genómicas de patogenicidade. O genoma de *S. agalactiae*, considerando a análise de sequenciação de genomas de varias estirpes, contém um grande número de ilhas genómicas, o que constitui uma característica única relativamente aos genomas conhecidos de outras espécies estreptocócicas. Estas ilhas evoluem muito rapidamente, sugerindo que os fenómenos de transferência horizontal de genes ocorrem de forma constante. Em particular, o aparecimento de clones hipervirulentos de *S. agalactiae* pode ser resultado destes mesmos eventos de transferência genética (Blumberg *et al.*, 1996; Glaser *et al.*, 2002; Quentin *et al.*, 1995). Glaser e co-autores descreveram catorze ilhas genómicas de patogenicidade para a estirpe de referência de origem humana NEM316 (Glaser *et al.*, 2002), as quais se pensava estarem associadas ao potencial patogénico de determinados tipos capsulares, nomeadamente do tipo III. No entanto, estudos de Herbert e colaboradores (Herbert *et al.*, 2005) apontam para o facto de apenas quatro, das catorze ilhas identificadas serem verdadeiras ilhas de patogenicidade (I, VI, X e XII), já que parece não existir uma associação absoluta entre a sua presença e o potencial patogénico das estirpes. Relativamente ao genoma sequenciado da estirpe de *S. agalactiae* origem bovina, a maioria dos genes específicos (~85%) reúnem-se em oito ilhas genómicas, o que foi considerado sugestivo de aquisição por transferência horizontal (Finch e Martin, 1984; Wanger e Dunny, 1987). Para além disso, foi identificada uma elevada porção de sequências de inserção (4,3% do genoma total), o que sugere a existência de rearranjos genómicos frequentes (Finch e Martin, 1984; Wanger e Dunny, 1987). Relações genéticas e evolutivas entre estirpes humanas e bovinas de *S. agalactiae* foram

avaliadas por análise filogenética com base na técnica MLST, confirmando uma clara distinção entre as populações bacterianas que infectam o Homem e as que infectam os bovinos (Bisharat *et al.*, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004; Dogan *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2010; Sukhnanand *et al.*, 2005). No entanto, o clone hipervirulento ST17 demonstrou ser a única linhagem humana próxima da estirpe de origem bovina ST61, o que foi considerado sugestivo da evolução do clone ST17 a partir de um ancestral bovino (Bisharat *et al.*, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2011).

A existência de inúmeros fagos em *S. agalactiae*, terá igualmente contribuído para a diversificação genómica, evolução e eventual virulência destes microorganismos (Brussow *et al.*, 2004; Canchaya *et al.*, 2002). De facto, estudos recentes demonstraram que os genes provenientes de fagos correspondem a cerca de 10% dos genes específicos de cada estirpe, o que pode estar relacionado com a adaptação ao nicho ecológico (Tettelin *et al.*, 2002, 2005; Suttle *et al.*, 2005, 2007).

### 1.2.6 Factores de Virulência

A ocorrência de infecções estreptocócicas invasivas depende de diversas características bacterianas, como a capacidade de produzir factores de virulência, mas também de factores específicos do hospedeiro (sistema imunitário comprometido ou patologias associadas). *S. agalactiae* é extremamente eficiente na realização de mecanismos essenciais à patogénese, tais como, adesão e colonização de superfícies epiteliais e mucosas, competição com a flora microbiana local, penetração no tecido epitelial do hospedeiro (principalmente do epitélio alveolar e endotelial), multiplicação no local de infecção, evasão ao sistema imunitário e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Baron e Kasper, 2005; Maisey *et al.*, 2009; Spellerberg, 2000). As diferenças no potencial patogénico entre isolados de colonização e de infecção têm suscitado diversas questões relativamente à eventual existência de características biológicas únicas que possam favorecer a infecção, nomeadamente a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica nos casos de meningite. Contudo, o processo biológico através do qual uma estirpe de colonização adquire capacidade de causar infecção ainda não foi decifrado. Pensa-se que as diferenças de patogenicidade estejam relacionadas com os diversos factores de virulência (tabela 1.1) apresentados por *S. agalactiae*, dos quais alguns estão associados à sua capacidade de colonização, enquanto que outros subvertem várias barreiras fisiológicas culminando na infecção (Spellerberg, 2000).

A patogénese das infecções por *S. agalactiae* desenvolve-se em três etapas principais: (1) adesão/colonização; (2) invasão/danos no hospedeiro; e (3) sobrevivência *in vivo*/evasão ao sistema imunitário do hospedeiro.

(1) A colonização (assintomática) constitui um pré-requisito para o desenvolvimento de infecção; para tal, é necessário que ocorra a adesão da bactéria à parede celular das células do hospedeiro através de proteínas de superfície (adesinas), nomeadamente a C5a peptidase e a proteína

Lmb, ou por apêndices filamentosos designados por Pili. A proteína C5a peptidase, codificada pelo gene *scpB*, desempenha um importante papel como adesina, ao ligar-se à fibronectina das células epiteliais (Cheng *et al.*, 2002; Liu e Nizet, 2004) e a proteína Lmb, codificada pelo gene *lmb*, e maioritariamente presente em estirpes de *S. agalactiae* de origem humana, promove a ligação da bactéria à laminina (glicoproteína da membrana basal do hospedeiro) (Safadi *et al.*, 2010; Spellerberg *et al.*, 1999); contudo, nem todos os isolados a expressam (Lindahl *et al.*, 2005; Spellerberg *et al.*, 1999). A recente identificação da estrutura Pili de *S. agalactiae* (Lauer *et al.*, 2005) veio fornecer novas evidências na relação hospedeiro-bactéria, nomeadamente pelo seu potencial envolvimento na ligação e adesão à célula hospedeira, bem como pela interacção com componentes da matriz extracelular e formação de biofilmes (Konto-Ghiorgi *et al.*, 2009; Rinaudo *et al.*, 2010).

(2) Após a adesão celular e colonização das mucosas, *S. agalactiae* pode disseminar-se através da secreção de toxinas ou da utilização de factores de virulência conhecidos como invasinas, que facilitam a sua entrada e permanência no interior das células hospedeiras (Adderson *et al.*, 2003; Doran e Nizet, 2004; Maissey *et al.*, 2008). A infecção intracelular por *S. agalactiae* pode resultar na perda de integridade dos tecidos do hospedeiro e consequente inflamação, contribuindo para o desenvolvimento do processo infeccioso. Toxinas de *S. agalactiae* como a  $\beta$ -hemolisina, o factor CAMP (*Christie-Atkins-Munch-Petersen*) e a hialuronidase causam danos nas células hospedeiras que promovem a libertação dos nutrientes necessários à sobrevivência intracelular da bactéria (Herbert *et al.*, 2004). A  $\beta$ -hemolisina (CylE), é codificada pelo gene *cyl* e é responsável pela reacção de  $\beta$ -hemólise, que se pode observar em redor das colónias de *S. agalactiae*, em gelose de sangue, devido à destruição total dos eritrócitos. Esta citolisina tem capacidade de formar poros nas células hospedeiras e tem sido associada à ocorrência de danos no epitélio pulmonar (Liu e Nizet, 2004) e endotelial (Gibson *et al.*, 1999), mais evidente na infecção neonatal de início tardio. É importante salientar que nem todas as estirpes de *S. agalactiae* são  $\beta$ -hemolíticas, por exemplo, as estirpes bovinas não causam hemólise. O factor CAMP, igualmente importante (mas não essencial) para a invasão celular, é uma proteína extracelular com a capacidade de formar poros nas células, promovendo a lise das mesmas (Spellerberg, 2000). A hialuronidase é uma enzima que promove a hidrólise do ácido hialurónico presente na matriz extracelular de tecidos animais. Esta degradação facilita a disseminação do agente patogénico pelo tecido e fornece nutrientes após a lise do ácido hialurónico. A hialuronidase é codificada pelo gene *hyl*, altamente expresso em estirpes do tipo III, em particular pelos isolados de infecções invasivas (Hynes e Walton, 2000). Outro factor de virulência importante para a invasão de *S. agalactiae* é o antígeno C, que consiste num complexo proteico composto pelas proteínas alfa e beta. Este antígeno de superfície pode conferir à célula bacteriana a capacidade de resistência à fagocitose e consequente destruição por polimorfonucleares. Aproximadamente 60% das estirpes dos tipos Ia, Ib e II contêm pelo menos um dos componentes proteicos do antígeno C, ao contrário das estirpes pertencentes ao tipo III, das quais apenas cerca de 1% possuem esse(s) componente(s) (Doran e Nizet, 2004). As proteínas pertencentes à família *Alpha-like proteins* (Alp), do antígeno C são proteínas de

superfície caracterizadas por longas sequências de repetição em *tandem*: Alpha C, Rib, Epsilon (Alp1), Alp2, Alp3 e Alp4 (Creti *et al.*, 2004). Apesar do seu papel biológico ainda não ter sido completamente elucidado, as Alp revelaram capacidade para promover a invasão das células epiteliais por *S. agalactiae*, através da interação com glicosaminoglicanos da célula hospedeira, e foram associadas à variação antigénica. Diversos estudos relataram a associação das proteínas Alp com os tipos capsulares (Kong *et al.*, 2002; Lindahl *et al.*, 2005). O tipo Ia foi associado às proteínas Alpha C, Alp1 e Alp2, os tipos Ib e IV foram associados às proteínas Alpha C e Alp1, os tipos II e III apresentam frequentemente a proteína Rib e a maioria das estirpes pertencentes ao tipo V apresenta a proteína Alp3. (Gherardi *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2002).

(3) Após transposição das barreiras celulares, *S. agalactiae* atinge a corrente sanguínea ou estruturas mais profundas dos tecidos, desencadeando uma resposta imunológica, na qual as células fagocíticas do hospedeiro desempenham um papel crucial. *S. agalactiae* dispõe de diversos factores de virulência que conferem resistência à opsonização e fagocitose, promovendo a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro. A esmagadora maioria dos isolados de *S. agalactiae* associados a doença invasiva são encapsulados, sendo que o ácido siálico, presente na superfície capsular confere resistência à opsonização/fagocitose, ou seja, protege o microorganismo da deposição dos fragmentos opsonizantes C3b do sistema complemento, que sinalizam a migração de células de defesa do sistema imune para o local de infecção (Rajagopal, 2009; Spellerberg, 2000); para além disso, a cápsula, tem a capacidade de mimetizar epitopos do hospedeiro (variação antigénica) impedindo o seu reconhecimento e bloqueando o acesso de moléculas de reconhecimento do hospedeiro (exemplo: *Toll-like receptors*) a componentes da parede celular, já que os mesmos se encontram ocultos pelo invólucro capsular (Doran e Nizet, 2004). A proteína C5a peptidase, desempenha um importante papel nesta etapa, uma vez que tem a capacidade de clivar o componente C5a do sistema do complemento, sendo que este não se forma na presença da C5a peptidase e, consequentemente, diminui o recrutamento de neutrófilos para o local de infecção (Beckmann *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2002; Chmouryguina *et al.*, 1996; Maissey *et al.*, 2008; Spellerberg, 2000). A proteína de superfície BibA, codificada pelo gene *gbs2018*, é uma adesina que desempenha um papel importante na inibição de outros componentes do sistema do complemento, uma vez que ao ligar-se ao componente C3b promove a resistência à fagocitose e a adesão às células epiteliais (Ring *et al.*, 2002). Por fim, a  $\beta$ -hemolisina é igualmente importante nesta fase, uma vez que estimula a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Ring *et al.*, 2002), promove a apoptose dos mesmos (Henneke *et al.*, 2002), a libertação de interleucina-8 e a hipotensão arterial (Doran *et al.*, 2002).

**Tabela 1.1** Factores de virulência em *S. agalactiae* e respectivo contributo para a patogénese.

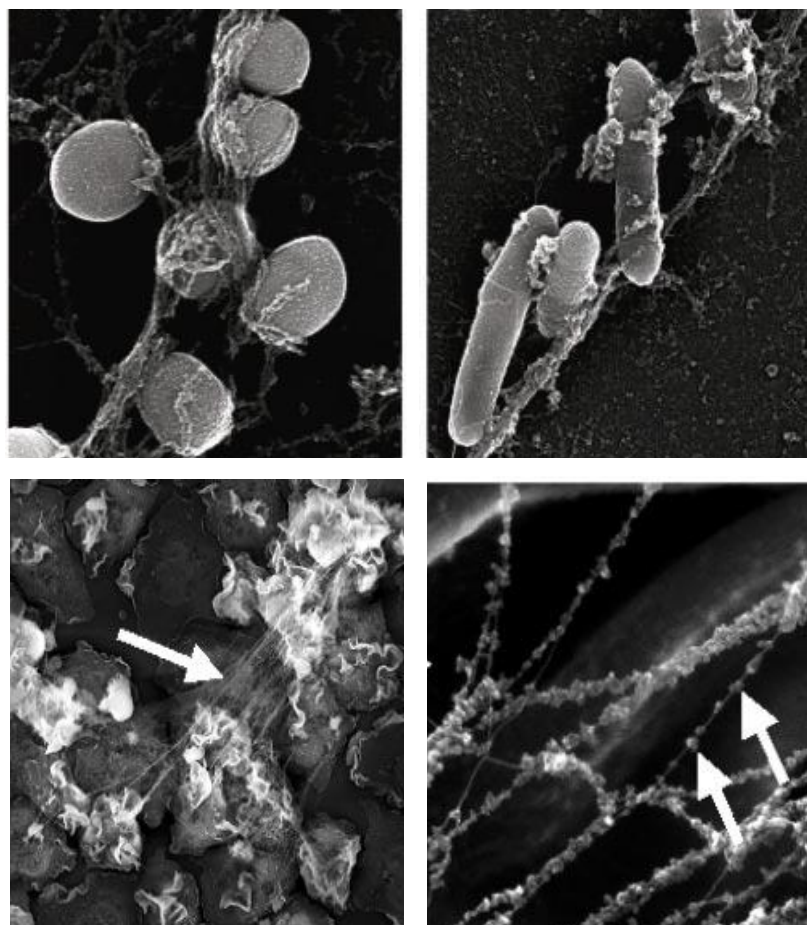
Factores de Virulência	Adesão/Colonização	Sobrevivência <i>in vivo</i> /Evasão ao sistema imunitário do hospedeiro	Invasão/Danos no hospedeiro
Ácido Siálico		x	
<i>Alpha-like proteins</i> (Alp)			x
$\beta$ -hemolisina		x	x
BibA		x	
Cápsula		x	
C5a peptidase (ScpB)	x	x	
Factor CAMP			x
Lmb	x		
Pili	x		

### 1.2.6.1 DNases

Os neutrófilos são efectores-chave da resposta imunitária inata do hospedeiro, desempenhando um papel crucial na resolução de infecções microbianas. Para além da sua função fagocítica podem contribuir para a eliminação dos agentes patogénicos através da produção de armadilhas extracelulares, designadas por *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Figura 1.2) (Brinkmann *et al.*, 2004). Sob activação, os neutrófilos, viáveis e não viáveis, produzem, maioritariamente constituídas por DNA mitocondrial e nuclear, respectivamente, bem como por histonas e proteínas granulares (elastase e mieloperoxidase). As NETs têm a capacidade de ligação a algumas bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos, facilitando o aprisionamento destes microorganismos, bem como a concentração de proteases nocivas para os mesmos (Brinkman *et al.*, 2004; Berends *et al.*, 2010; von Köckritz-Blickwede *et al.*, 2009). Estudos recentes efectuados em *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* demonstraram que os microorganismos capturados pelas NETs permanecem vivos, evidenciando o papel destes na captura mas não na morte microbiana (Menegazzi *et al.*, 2012). A libertação das NETs é desencadeada em resposta a estímulos inflamatórios (LPS, IL-8 e TNF), que ocorrem após ruptura da membrana citoplasmática do neutrófilo, durante um processo de morte celular especial designado por “*Netosis*” (Brinkmann e Zychlinsky, 2007; Fuchs *et al.*, 2007; Remijsen *et al.*, 2011).

Publicações recentes realçam o papel da actividade das nucleases extracelulares nos processos de evasão ao sistema imunitário de algumas bactérias, tais como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* e *S. aureus* (Beiter *et al.*, 2006; Berends *et al.*, 2010; Sumby *et al.*, 2005), sendo que tal evasão pode ser facilitada pela degradação das NETs (Brinkman *et al.*, 2004). Existem muitas bactérias patogénicas que produzem DNases, no entanto o benefício desta actividade enzimática ainda não se encontra totalmente compreendido (Sumby *et al.*, 2005). De facto, apesar das DNases terem sido das primeiras proteínas a ser identificadas e extensamente caracterizadas em *S. agalactiae*, ainda não existe nenhuma evidência directa que as implique na patogénese desta bactéria (Ferrieri *et al.*, 1975, 1980). De forma indirecta, a existência de anticorpos para as DNases em recém-nascidos e adultos colonizados com *S. agalactiae*, indica que estas proteínas são produzidas *in vivo* e são imunogénicas. Uma importante limitação na investigação do eventual papel patogénico das DNases consiste no desconhecimento dos genes que codificam e regulam estas enzimas em *S. agalactiae*. Contudo, contrastando com a total ausência de dados em *S. agalactiae*, foram recentemente identificados alguns genes localizados (no cromossoma ou em fagos), responsáveis pela actividade das DNases em *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* (Beiter *et al.*, 2006).

Estudos recentes (Flemming e Wingender, 2010; Goller e Romeo, 2008; Karatan e Watnick, 2009) evidenciam a existência de uma relação entre as DNases e a produção de biofilmes, os quais consistem em comunidades biológicas, estruturadas, coordenadas e funcionais que constituem uma forma de protecção ao desenvolvimento dos microorganismos, permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis. De acordo com estes estudos, dado que a matriz que envolve o biofilme bacteriano contém DNA extracelular (eDNA), a produção de DNases influenciaria o nível de eDNA e, consequentemente o desenvolvimento da arquitectura típica dos biofilmes, bem como a sua utilização como fonte de nutrientes. Estudos bastante recentes revelam que, durante a infecção, a dissolução dos biofilmes, impulsionada pela actividade das DNases constitui um passo crucial para a adaptação dos microorganismos, conferindo-lhes capacidade de colonização (Kiedrowski *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2011).



**Figura 1.2** *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) visualizadas por Microscopia Electrónica, adaptado de Brinkman *et al.*, 2004.

Estes dados são encorajadores dado que representam novidades promissoras na investigação de *S. agalactiae* relativamente à avaliação do papel biológico das DNases na patogénese desta bactéria. Assim, o presente trabalho tem como principais objectivos correlacionar a actividade das DNases extracelulares com os seguintes parâmetros em estudo: estrutura genotípica, para a qual se pretende uma avaliação da sua distribuição entre isolados de colonização e infecção; hospedeiro (origem humana ou bovina), pretendendo-se a identificação de perfis genéticos entre ambos os grupos de isolados; e origem clínica (colonização e infecção). Posto isto, pretende-se a obtenção de informação relevante que possa contribuir para o conhecimento do papel biológico das DNases extracelulares na patogénese de *S. agalactiae*.





## 2. Material e Métodos

### 2.1 Colecção de estirpes de *S. agalactiae*

#### 2.1.1 Estirpes de referência e clínicas de *S. agalactiae*

Para a realização do presente estudo foram utilizadas estirpes de referência de *S. agalactiae* pertencentes a linhagens genéticas distintas [2603V/R (genótipo: V/ST110); COH1 (genótipo: III/ST17); NEM316 (genótipo: Ia/ST23); O90R (genótipo: Ia/ST25)], bem como estirpes de origem bovina e humana.

As estirpes de origem bovina (n=60) foram isoladas de casos de mastite subclínica observados em Portugal nos anos de 2002 e 2003 e já haviam sido objecto de caracterização prévia (tabela 2.1) (Rato *et al.*, 2012).

**Tabela 2.1** Colecção de estirpes de origem bovina utilizada no presente estudo. Número de estirpes de referente a cada serotipo/genótipo capsular.

Serótipo/Genótipo Capsular		ST	Número total de isolados
	III-3	23	1
	V	2	14
	New 1 <sup>b</sup>	2	6
	New 2 <sup>b</sup>	61	11
NT <sup>a</sup>	New 3 <sup>b</sup>	61 (4), 554 (20)	24
	New 4 <sup>b</sup>	61	1
	New 5 <sup>b</sup>	2	3

<sup>a</sup>Estirpes consideradas não-tipáveis pela técnica de serologia capsular e sujeitas à análise do polimorfismo dos *loci* capsulares *cpsD-E-F*; <sup>b</sup>Definição baseada na ausência de homologia relativamente aos serótipos capsulares descritos em *S. agalactiae*.

As estirpes de origem humana (colonização e infecção) foram seleccionadas com base no cálculo de uma amostragem estratificada, determinada através de análise estatística realizada com recurso à aplicação informática SPSS (Software SPSS, Versão 16.0, IBM), com base nos seguintes critérios: i) distribuição dos tipos capsulares em 100 estirpes de colonização isoladas na região de Lisboa (Florindo *et al.*, 2010; tabela 2.2), ii) correlação entre o tipo capsular e a produção de DNases na colecção de estirpes referida em i), cujos resultados preliminares obtidos pelo laboratório de acolhimento [Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Doenças Infecciosas, Unidade de Referência de Doenças Sexualmente Transmissíveis (INSA – DDI/URST)] estão descritos na tabela 2.2; e iii) hipotético aumento do valor percentual da produção de DNases na colecção de estirpes de infecção, em relação às estirpes de colonização. Dado que o papel biológico das DNases, em *S. agalactiae* poderá estar relacionado com a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro e consequente estabelecimento de infecção, foi explorada a hipótese de um maior envolvimento deste factor de virulência em estirpes invasivas.

**Tabela 2.2** Resultados preliminares da prevalência dos serotipos/genótipos capsulares e da produção de DNases, em estirpes de *S. agalactiae* de colonização de origem humana (n=100), utilizados para cálculo da amostragem estatística<sup>1</sup>.

Serótipo/Genótipo Capsular	Prevalência (%) <sup>a</sup>	Produção DNases (%) <sup>b</sup>
Ia	16%	100%
Ib	3%	100%
II	10%	70%
III-1	22%	45%
III-2	13%	100%
IV	3%	100%
V	33%	90%

<sup>a</sup>Florindo *et al.*, 2010; <sup>b</sup>Com base em resultados preliminares obtidos no laboratório INSA (DDI/URST)

No âmbito deste trabalho, com base nos critérios de amostragem referidos, foi definido o conjunto de estirpes de origem humana (colonização e infeção) patente na tabela 2.3. Foram estudadas 157 estirpes de colonização, isoladas a partir do exsudado ano-genital de parturientes no último trimestre de gestação, de acordo com as normas internacionais do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2010); e 128 estirpes de infecção (tabela 2.3), isoladas a partir de amostras biológicas de fluidos corporais geralmente estéreis (sangue periférico, LCR e líquido pleural) de

<sup>1</sup> Amostragem realizada com o apoio do Departamento de Epidemiologia do INSA

crianças com idade igual ou inferior a 3 meses, com quadro clínico sugestivo de septicémia ou meningite.

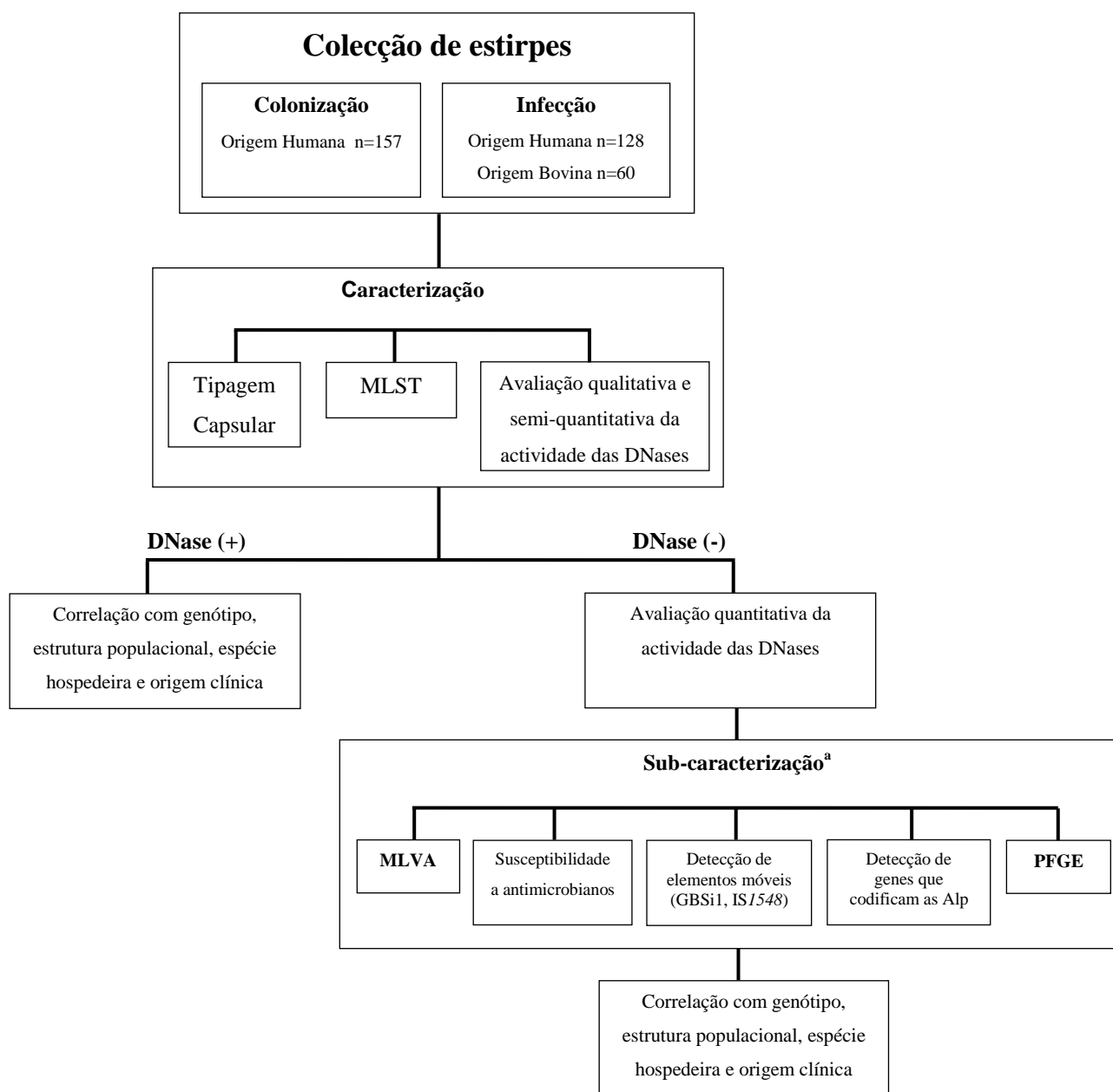
As estirpes de colonização foram seleccionadas a partir de estirpes isoladas no âmbito da rotina laboratorial de diagnóstico de infeções por *S. agalactiae* no INSA (DDI/URST), em utentes de consultas de clínica geral e ginecologia/obstetrícia, da área metropolitana de Lisboa, entre 2005 e 2008 e as estirpes de infecção são provenientes de todos os hospitais pediátricos e laboratórios microbiológicos afiliados na Alemanha, no período compreendido entre 2001 e 2003 (Fluegge *et al.*, 2011).

**Tabela 2.3** Colecção de estirpes de colonização e infecção referente a cada serotipo/genótipo capsular, utilizada no presente estudo.

Serótipo/Genótipo Capsular	Número de estirpes colonização (n=157)	Número de estirpes Infecção (n=128)
Ia	20	20
Ib	10	10
II	39	17 <sup>a</sup>
III-1	29	29
III-2	29	29
IV	10	3 <sup>a)</sup>
V	20	20

<sup>a</sup>O número de estirpes de infecção previamente definido por amostragem não foi alcançado, dada a reduzida prevalência do serótipo na infecção neonatal (Fluegge *et al.*, 2011).

Com o intuito de correlacionar a actividade das DNases em *S. agalactiae* com dados epidemiológicos moleculares e fenotípicos, constitui-se o seguinte plano de estudo (Figura 2.1):



**Figura 2.1** Algoritmo de tipagem das estirpes de *S. agalactiae* e de avaliação da actividade das DNases.

<sup>a</sup>Dado que estudos anteriores (Ferrieri *et al.*, 1975, 1980) e dados preliminares do laboratório (tabela 2.2) sugerem que a maioria de estirpes são produtoras de DNases, limitando portanto a correlação entre as variáveis em estudo (genótipo, espécie hospedeira e origem clínica) procedeu-se a uma subcaracterização fenotípica e molecular de estirpes não produtoras de DNases por forma a tentar correlacionar ausência de produção com os diferentes fenótipos e genótipos em estudo.

## 2.2 Propagação de *S. agalactiae*

As estirpes utilizadas no presente estudo, encontravam-se armazenadas a -80°C em tubos de criopreservação *Cryoinstant Red* (VWR, Prolabo, Bélgica) pelo que antes de proceder aos ensaios moleculares foram descongeladas e semeadas em placas de meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux, Marcy l’Etoile, França), e incubadas durante um período de 24/48h a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.3 Extracção de DNA

O DNA de cada uma das estirpes foi extraído através do sistema comercial *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, Valencia, EUA), de acordo com o protocolo para bactérias Gram-positivas. Em suma, procedeu-se à lise com 30 U de mutanolisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 20 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) durante 2 horas a 37°C, a partir de suspensões celulares de *S. agalactiae*, 0.5 na escala de McFarland (BioMérieux, Marcy l’Etoile, França), de volume final de 200 µl. Este procedimento foi seguido de digestão com proteinase K (10 mg/ml) e tampão AL durante 30 minutos a 56°C. Após a eluição em 200 µl de tampão AE, foi determinada a concentração de DNA por espectrofotometria ( $\lambda=260$  nm) antes de se proceder ao seu armazenamento (-80°C).

## 2.4 Purificação e Sequenciação de DNA

A caracterização molecular envolvendo sequenciação de regiões cromossómicas obrigou à purificação prévia dos produtos amplificados por PCR. A purificação dos amplicões foi realizada através do sistema comercial QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Valencia, EUA) segundo as instruções do fabricante, tendo-se procedido à eluição final em 35 µl de tampão EB. Cada reacção de sequenciação incluiu 0,5 µl de produto amplificado purificado e reagente *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para um volume final de 10 µl. A sequenciação foi realizada na Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA por técnicos especializados, no sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com o seguinte perfil: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 30 s, seguido de 25 ciclos de desnaturação - emparelhamento - extensão (95°C, 10 s; 50°C, 5 s; 60°C, 4 min).

## 2.5 Tipagem capsular em *S. agalactiae*

A identificação/classificação dos tipos capsulares de estirpes de *S. agalactiae* foi realizada por serologia, com anticorpos específicos para os antígenos capsulares, através do sistema comercial *GBS Serotyping Kit*, (ESSUM ProBiotics, Umea, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. Este sistema compreende 10 antisoros ligados a partículas látex e permite determinar o serótipo por observação de aglutinação na presença do respectivo serótipo de *S. agalactiae*, possibilitando a identificação dos 10 serótipos actualmente conhecidos para *S. agalactiae* (10 antígenos capsulares): Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX), tal como anteriormente referido na secção 1.2.2 do capítulo Introdução. Para os casos não tipáveis (NT)<sup>1</sup> por serologia, bem como para a subtipagem das estirpes com serótipo III, foi realizada a avaliação do polimorfismo dos *loci* capsulares *cpsD-E-F* após amplificação e sequenciação, segundo o método descrito por Florindo e co-autores (Florindo *et al.*, 2010). No presente estudo, os tipos capsulares (Ia, Ib, II-V) serão designados por “serótipos”, enquanto os subtipos da cápsula do tipo III (III-1 e III-2) serão designados por “genótipos” e/ou “subtipos”. Em suma, cada amostra de DNA de uma estirpe NT foi sujeita a amplificação dos genes *cpsD-E-F* por PCR, tendo sido usada uma mistura reaccional constituída por: solução tampão 1x (Bioline, Londres, Inglaterra), 2.8 mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline, Londres, Inglaterra), 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato - dNTP's (Bioline, Londres, Inglaterra), 25 pmol de cada iniciador (“*primer*”) “*forward*” (directo) e “*reverse*” (inverso) específicos para cada um dos sete genes (Anexo I), 1.5 U de *Bio-X-Act Proof-reading DNA polymerase* (Bioline, Londres, Inglaterra) e 10 µl de DNA para um volume final de 25 µl. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), com o seguinte perfil de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C durante 3 min. e emparelhamento a 51 °C durante 1 min.; seguido de 35 ciclos compostos por: extensão a 72°C durante 2 min e 25 s., desnaturação a 95°C durante 30 s. e emparelhamento a 51°C durante 30 s.; a reacção termina com um ciclo final de extensão a 72°C durante 10 min (Florindo *et al.*, 2010).

A visualização dos produtos de PCR (pPCR) foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA) em solução tampão TBE 1x [44.5mM Tris, 44.5mM ácido bórico, 1 mM de EDTA pH 8.3 (Sigma, St. Louis, EUA)] a 5V/cm durante 90 a 120 minutos, utilizando o reagente *Sybr Safe* (Invitrogen, EUA) como corante de DNA e o marcador de peso molecular Hyperladder I (Bioline, Londres, Inglaterra).

A purificação e sequenciação dos pPCR foram realizadas de acordo com o método descrito na secção 2.4. A identificação do genótipo capsular das estirpes de *S. agalactiae* foi realizada por análise do alinhamento das respectivas sequência *cpsD-cpsE-cpsF* com as obtidas para as estirpes de referência pertencentes aos genótipos Ia, Ib, II, III-1, III-2, III-3, III-4, IV, V, VI, VII, VIII e IX, com recurso às aplicações bioinformáticas *EditSeq* e *MegaAlign* (Lasergene99, Madison, EUA). Os

---

<sup>1</sup> Aglutinação simultânea com mais de um serótipo ou ausência de aglutinação.

números de acesso no GenBank para as estirpes de referência representativas de cada genótipo, utilizadas no âmbito deste trabalho, são: Ia/090, AF332894 para Ia/NCDC SS615, AF332903 para 12 Ib/H36B, AF332905 para II/18RS21, AF332900 para III-1/GB00-009, AF332896 para III-2/M781, AF332897 para III-3/NCDCSS620, AF381030 para III-4/WC3935, AF332908 para IV/3139, AF332910 para V/CJB111, AE009948 para V/2603V-R, AF349539 para V/CNCTC 1-82, AF337958 para VI/NT6 e AF332913 para VII/7271).

## 2.6 Identificação das Linhagens Genéticas por MLST

A identificação das linhagens genéticas das estirpes em estudo foi determinada através da amplificação e sequenciação de fragmentos internos (~500pb) de sete genes constitutivos (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkt*) de acordo com o método descrito por Jones e co-autores (Jones *et al.*, 2003), o qual está disponível através do acesso à base de dados pública: <http://pubmlst.org/sagalactiae/>.

Através da análise do polimorfismo de cada um destes genes verifica-se que sequências nucleotídicas diferentes correspondem a alelos distintos. As sequências dos alelos dos diferentes *loci* foram introduzidas e examinadas na base de dados pública MLST ([pubmlst.org/sagalactiae](http://pubmlst.org/sagalactiae/)), a qual lhes atribuiu individualmente um algarismo, de acordo com o alelo representativo de cada sequência génica. Cada estirpe foi caracterizada por um perfil alélico que corresponde ao conjunto dos alelos determinados para os sete *loci* considerados. Considera-se que estirpes com o mesmo perfil alélico pertencem à mesma sequência-tipo ou ST e definiu-se como complexo clonal (CC) o conjunto de estirpes que partilha entre si seis ou setes alelos idênticos. Estirpes com variação em um ou dois *locus* foram denominados por SLV (*single-locus variation*) e DLV (*double-locus variation*), respectivamente.

A amplificação e a detecção dos pPCR das amostras foram efectuadas de modo similar ao descrito no ponto 2.5, com as seguintes modificações: *primers* ou iniciadores (Anexo I); temperatura de hibridação dos iniciadores de 55°C; tempo de extensão de 1 minuto e 10 segundos; gel de agarose 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA); e a utilização do marcador de peso molecular Hyperladder IV (Bioline, Londres, Inglaterra). A purificação e sequenciação dos pPCR foram realizadas de acordo com o método descrito na secção 2.4.



## 2.7 Avaliação da actividade das DNases em estirpes de referência e clínicas

### 2.7.1 Ensaios Qualitativos

A produção de DNases foi avaliada de forma qualitativa, por inoculação de todas as estirpes (de origem humana e bovina) da colecção de *S. agalactiae* em placas de *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), tendo sido utilizada a estirpe de referência O90R, como controlo positivo, de forma de validar o ensaio. A interpretação dos resultados foi efectuada após 24 horas de incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As estirpes foram consideradas produtoras de DNases aquando da visualização de halos em torno das colónias de *S. agalactiae*.

### 2.7.2 Ensaios Semi-quantitativos e Quantitativos

A avaliação semi-quantitativa da actividade das DNases foi realizada para todas as estirpes da colecção de *S. agalactiae* (de origem humana e bovina), por forma a confirmar os resultados obtidos nos ensaios qualitativos em *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), tendo em conta as limitações de interpretação/visualização dos mesmos. A avaliação quantitativa da actividade das DNases foi realizada apenas para as estirpes definidas como não produtoras de DNases com base na interpretação obtida pelos métodos qualitativos e semi-quantitativos. Para tal, foram igualmente avaliadas estirpes clínicas e de referência, produtoras de DNases, pertencentes a vários complexos clonais, as quais funcionaram como controlo da acção destas nucleases, de forma a proceder à validação dos ensaios.

Estas metodologias foram realizadas com base nos métodos descritos por Sumby e co-autores (Sumby *et al.*, 2005) e (Tolun e Myers, 2003), aos quais foram introduzidas algumas modificações. Assim, procedeu-se à inoculação das estirpes em 5 ml de meio de cultura enriquecido e selectivo, Todd-Hewitt suplementado com 0.5% de extracto de levedura - THY (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), o qual contém na sua composição agentes antimicrobianos [gentamicina (8 µg/ml) ou colistina (10 µg/ml) e ácido nalidíxico (15 µg/ml)] de forma a inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas e de outros microorganismos presentes (Shet and Ferrieri, 2004; Beitune *et al.*, 2005; Borger *et al.*, 2005). A colheita do sobrenadante das culturas de *S. agalactiae* em fase estacionária foi efectuada por centrifugação (10 min., 3000rpm) e filtração (0.2 µm). Posteriormente, procedeu-se à incubação (37°C) de 1 µg de DNA<sup>1</sup> em dupla cadeia (dsDNA) com diferentes volumes de sobrenadante na presença de tampão M 1x (Roche, Portugal), durante quatro pontos horários: 1h, 2h, 4h e “overnight” (~17h), de forma a avaliar a digestão de DNA, num volume reacção de 50 µl.

---

<sup>1</sup> DNA bacteriano amplificado para o gene *atr* utilizado como substrato

A avaliação semi-quantitativa foi realizada com base na visualização da degradação do DNA em gel de agarose, tendo-se para tal procedido à electroforese de 20 µl de cada produto de digestão (5V/cm durante 90 min), em gel de agarose 1% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA) [corante DNA: Sybr Safe (Invitrogen, EUA), tampão TBE 1x [44.5mM Tris, 44.5mM ácido bórico, 1mM de EDTA pH 8.3 (Sigma, St. Louis, EUA)] e marcador de peso molecular IV (Bioline, Londres, Inglaterra). Em todos os ensaios foi utilizado um controlo negativo, o qual consistiu na mistura reaccional sem sobrenadante, e um controlo positivo com adição de sobrenadante de uma estirpe de referência (O90R) produtora de DNases.

A avaliação quantitativa, a qual decorreu no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia/Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ICAT/FCUL) foi realizada através da medição da quantidade de DNA presente em cada amostra, após o término de cada período de incubação. Para tal, foi utilizado o reagente Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen (Invitrogen, EUA) para a quantificação do dsDNA por fluorimetria (excitação das amostras a 480 nm e emissão a 520 nm), de acordo com as instruções do fabricante.

Tendo por base dados preliminares obtidos no laboratório INSA - URST, as amostras foram previamente sujeitas ao processo de purificação (anteriormente descrito no ponto 2.4) de forma a eliminar potenciais inibidores do reagente Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen (Invitrogen, EUA).

Em suma, adicionou-se 1 ml de Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen 1x a igual volume de cada amostra previamente diluída em tampão TE 1x. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, em local desprovido de luz, procedeu-se à medição de fluorescência (Fluorímetro - Anthos, Zenith 3100) em microplacas de 96 poços e fundo plano específicas para fluorescência (*Corning 96 Well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC*, Costar, EUA). Para o cálculo das concentrações de DNA em cada amostra foi determinada uma recta padrão utilizando 4 diluições seriadas (1, 10, 100 e 1000 ng/ml) de uma solução inicial de 2 µg/ml de DNA de fago Lambda:  $y = 3675x$  ( $x$ = concentração de dsDNA, ng/ml;  $y$ = fluorescência); factor de correlação ( $R^2$ )= 0,9998. A cada valor de fluorescência obtido foi subtraído o valor de fluorescência do branco (solução Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen 1x e tampão TE 1x na proporção de 1:1). Os resultados finais foram determinados com base em três ensaios independentes.

## **2.8 Subcaracterização das estirpes não produtoras de DNases**

Com vista à identificação de clone (s) específico (s) associado (s) à não produção de DNases, foram realizadas diversas metodologias, de forma a proceder à caracterização molecular e fenotípica de um subgrupo de estirpes sem actividade ou com actividade reduzida de produção de DNases.

## 2.8.1 MLVA

A análise do número variável de repetições em *tandem* (VNTR), presentes nos genes *SAG2*, *SAG3*, *SAG4*, *SAG7*, *SAG21* e *SAG22*, de acordo com as sequências nucleotídicas das estirpes de referência 2603V/R, A909 e NEM316 foi realizada com base no procedimento descrito por Haguenoer e Colaboradores (Haguenoer *et al.*, 2011). A determinação do perfil alélico foi realizada com base na visualização do perfil de bandas presentes no gel de agarose. O número de repetições para cada VNTR foi deduzido a partir do tamanho do amplicão, por comparação com a estirpe de referência, para a qual o número de repetições era conhecido (tabela 2.4). O número atribuído a cada alelo corresponde ao número de repetições nesse gene, permitindo a definição de um genótipo MLVA para cada estirpe (perfil alélico).

As condições reacionais e o perfil de amplificação foram semelhantes ao descrito para o ponto 2.4 (Haguenoer *et al.*, 2011), com exceção dos iniciadores (Anexo I); da temperatura de hibridação dos iniciadores (55°C); tempo de extensão (1 minuto e 10 segundos); da percentagem de agarose [2% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA)] utilizada na preparação do gel e do marcador de peso molecular [Hyperladder IV (Bioline, Londres, Inglaterra)].

**Tabela 2.4** Características dos seis *loci* VNTR seleccionados para genotipagem pela técnica de MLVA (adaptado de Haguenoer *et al.*, 2011)

VNTR	Tamanho das repetições (pb)	Número de repetições			pPCR (pb)	Número de alelos	Tamanho min. e máx. dos amplicões (pb)
		2603 V/R	A909	NEM 316			
SAG2	32	3	3	3	244	3	212 - 276
SAG3	24	3	2	3	126	2	126 - 150
SAG4	60	3	1	1	114	6	114 - 414
SAG7	18	6	8	-	285	9	231 - 573
SAG21	48	-	14	18	783	26	117 - ~2000
SAG22	159	2	5	2	928	7	292 - 1246

## 2.8.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada directamente por E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), o qual compreende um gradiente de antibiótico pré-definido utilizado para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) em µg/ml. Este teste foi executado de acordo com as normas internacionais publicadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). No âmbito deste trabalho foram testados fenótipos de resistência a antimicrobianos considerados de primeira escolha como a Penicilina (Beta-lactâmico) e a Vancomicina (Glicopeptídeo), bem como a antimicrobianos considerados de segunda escolha, para os quais são geralmente observadas resistências, como a Eritromicina (Macrólido) e a Clindamicina (Lincosamida).

Para a execução dos antibiogramas foram realizadas suspensões celulares com uma turbidez de 0.5 na escala de McFarland (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). De acordo com as instruções do fabricante, o valor 0,5 da escala de McFarland corresponde a uma concentração bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. As estirpes foram semeadas por espalhamento em placas de meio sólido “Mueller-Hinton” suplementado com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e procedeu-se à colocação das tiras de E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), as quais se encontram identificadas com uma escala de leitura de CMI em µg/ml. O registo de resultados foi realizado após incubação a 37°C, em aerobiose, durante 18 a 24 horas. Para a validação dos valores de CMI foi utilizada como controlo a estirpe de referência para testes de susceptibilidade a antimicrobianos, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. De acordo com as normas internacionais padronizadas do CLSI (CLSI, 2009), os *Streptococcus* beta-hemolíticos são considerados sensíveis/susceptíveis aos antimicrobianos testados de acordo com os valores de CMI indicados na tabela 2.5, sendo o fenótipo de susceptibilidade detectado pela presença de uma elipse de inibição de crescimento bacteriano em redor da tira de E-test (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, França).

**Tabela 2.5** Antimicrobianos testados pelo método E-test<sup>a</sup>, de acordo com as normas publicadas pelo CLSI (CLSI, 2009)

Classe de Antimicrobianos	Antimicrobianos	CMI (µg/ml)
Beta-lactâmico	Penicilina	≤ 0.12 µg/ml
Glicopeptídeo	Vancomicina	≤ 1 µg/ml
Macrólido	Eritromicina	≤ 0.5 µg/ml
Lincosamida	Clindamicina	≤ 0.5 µg/ml

<sup>a</sup>BioMérieux, Marcy l'Etoile, França

### 2.8.3. Detecção de genes associados à resistência aos macrólidos

Foram pesquisados, por PCR, os seguintes genes associados à resistência aos macrólidos: *mef*(A), *erm*(A), *erm*(B). O procedimento foi realizado de acordo com método descrito por Florindo e co-autores (Florindo *et al.*, 2010).

As condições reacionais e o perfil de amplificação das amostras foram similares ao descrito no ponto 2.4, com exceção dos iniciadores (Anexo I), da temperatura de hibridação dos iniciadores (55°C), tempo de extensão (1 minuto e 10 segundos), percentagem de agarose [2% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA)] utilizada na preparação do gel e do marcador de peso molecular [Hyperladder IV (Bioline, Londres, Inglaterra)].

### 2.8.4 Detecção de elementos móveis (*GBSi1*, *IS1548*) na região intergênica *scpB-lmb*

A presença dos dois elementos móveis *GBSi1* e *IS1548* na região intergênica *scpB-lmb* foi avaliada segundo o método descrito por Safadi e colaboradores (Safadi *et al.*, 2010). Esta região pode apresentar três estruturas diferentes (Figura 2.2), assim, a detecção de um amplicão de 400 pb indica a ausência dos referidos elementos móveis, enquanto que amplicões na ordem dos 1600 e 2200 bp indicam a presença dos elementos móveis *IS1548* e *GBSi1*, respectivamente (Safadi *et al.*, 2010).

As condições reacionais e o perfil de amplificação foram semelhantes ao descrito no ponto 2.5, com exceção dos iniciadores (Anexo I), da temperatura de hibridação (55°C) e do tempo de extensão (2 minutos).



**Figura 2.2** Organização genômica da região intergênica *scpB-lmb*. (A) Ausência dos elementos móveis *IS1548* e *GBSi1* na região inter-gênica *scpB-lmb* é caracterizada pela detecção de um amplicão de 400 pb. (B) e (C) A presença dos elementos móveis *IS1548* e *GBSi1* na região inter-gênica *scpB-lmb* é caracterizada pela detecção de amplicões na ordem dos 1600 e 2200 bp, respectivamente (adaptado de Safadi *et al.*, 2010).

### 2.8.5 Pesquisa dos genes pertencentes à família de proteínas de superfície Alp

A pesquisa dos genes pertencentes à família *Alpha-like protein* (Alp) foi realizada com base no método descrito por Creti e colaboradores (Creti *et al.*, 2004), através da amplificação simultânea (PCR Multiplex) dos genes que codificam para as proteínas Alpha-C, Rib, Epsilon (ou Alp1), Alp2/Alp3 e Alp4. As condições reacionais e o perfil de amplificação foram semelhantes ao descrito no ponto 2.4, com excepção dos iniciadores (Anexo I), da temperatura de hibridação (56°C), do tempo de extensão (40 segundos), da percentagem de agarose [2% (p/v) (Sigma, St. Louis, EUA)] e do marcador de peso molecular usado [Hyperladder IV (Bioline, Londres, Inglaterra)].

### 2.8.6 PFGE

A técnica de PFGE foi realizada com vista a avaliar a relação genotípica (ou clonalidade) das estirpes clínicas não produtoras de DNases, tendo sido seleccionadas estirpes produtoras e não produtoras, de colonização e infecção, pertencentes a diferentes genótipos.

Esta técnica foi executada de acordo com o protocolo descrito por Rato e co-autores (Rato *et al.*, 2008). De forma breve, o DNA genómico foi imobilizado em matriz de agarose (SeaPlaque, Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA) e digerido com a enzima de corte raro *SmaI* (New England BioLabs, Beverly, USA), a qual reconhece a sequência 5'-CCC/GGG-3'. A electroforese em campo pulsado foi realizada no aparelho CHEF-MAPPER (Chiller System, Bio-Rad), segundo as seguintes condições: tempo inicial de pulso, 5 segundos; tempo final, 35 segundos; tempo de corrida, 23 horas; voltagem, 200 V (6 V/cm).

Os padrões de restrição obtidos pela técnica de PFGE foram analisados de acordo com os critérios descritos por Tenover e co-autores (Tenover *et al.*, 1995). Foram realizadas comparações entre os padrões de restrição através da construção de dendrogramas, os quais foram obtidos com recurso à aplicação informática BioNumerics (Software BioNumerics, Versão 4.0, Applied Maths), disponibilizada pelo Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia/ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ICAT/FCUL). O “Dice” foi utilizado como coeficiente de semelhança e o “UPGMA” (“*Unweighted pair group method with arithmetic averages*”) foi o método de agrupamento aplicado. Foi concedida uma tolerância de 1.5% entre a posição das bandas nos diferentes perfis e uma optimização de 0.0%. Todas as estirpes com o mesmo padrão de restrição obtido por PFGE são consideradas idênticas ou pertencentes à mesma estirpe; estirpes com perfis de restrição com uma semelhança inferior a 80% (Tenover *et al.*, 1995; Rato *et al.*, 2008) são consideradas como possivelmente não relacionados genotipicamente; e estirpes com perfis de restrição

com semelhança igual ou superior a 80% são consideradas como possivelmente relacionadas genotípicamente.

## **2.9 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o apoio do Departamento de Epidemiologia do INSA, com recurso à aplicação informática SPSS (Software SPSS, Versão 16.0, IBM). As associações estabelecidas entre as variáveis em estudo foram realizadas de acordo com o teste exacto de Fisher com um nível de significância de 5%.

A relação entre a não produção de DNases e as linhagens genéticas foi determinada com base na fórmula de odds ratio (OR) descrita por Brueggemann e co-autores (Brueggemann *et al.*, 2004), a qual se revelou bastante vantajosa, uma vez que os resultados estimados constituíram uma medida robusta da produção de DNases.

## 3.1 Resultados

No âmbito deste trabalho foi estudada uma colecção de 345 estirpes, constituída por 285 estirpes de origem humana (colonização n=157; infecção n=128) e 60 estirpes de infecção de origem bovina. As estirpes de origem humana foram seleccionadas com base no cálculo de uma amostragem estratificada, determinada segundo a distribuição dos tipos capsulares e a sua correlação com a produção de DNases, tal como anteriormente referido na secção 2.1.1 do capítulo Material e Métodos. Desta forma a serotipagem capsular, na colecção de estirpes de origem humana, foi previamente realizada (resultados indicados na tabela 3.1), por forma a ser possível a selecção das estirpes com base na amostragem definida estatisticamente. De acordo com o plano de estudo (ver Material e Métodos), a colecção de estirpes de origem humana foi caracterizada por MLST, avaliação da actividade das DNases, MLVA, padrão de resistência a antimicrobianos, detecção de elementos móveis e proteínas de superfície da família Alp e padrão de restrição por PFGE.

### 3.1 Identificação das Linhagens Genéticas em cada Serótipo/Genótipo Capsular (estirpes humanas) - análise MLST

A determinação da linhagem genética de todas as estirpes da colecção pertencente aos serótipos Ia a V, foi efectuada por MLST. Foram identificados diferentes STs, inclusivamente em estirpes com o mesmo tipo capsular (tabela 3.1), tendo sido identificadas cinco linhagens genéticas: CC1, CC12, CC17, CC19 e CC23. Em particular, os serótipos II e IV foram os que demonstraram maior heterogeneidade, tendo sido identificados vários STs distintos pertencentes aos complexos clonais CC1, CC12, CC19, CC23 e CC1, CC12, CC23, respectivamente. No entanto, existem genótipos capsulares para os quais esta heterogeneidade não se verificou, estando os mesmos relacionados com uma determinada linhagem, nomeadamente Ia/CC23, III-1/CC19, III-2/CC17 e V/CC1.

Em relação à origem das estirpes (colonização ou infecção), as linhagens genéticas identificadas, pertencentes ao mesmo serótipo/genótipo capsular, foram semelhantes entre si, demonstrando uma independência relativamente à origem clínica.



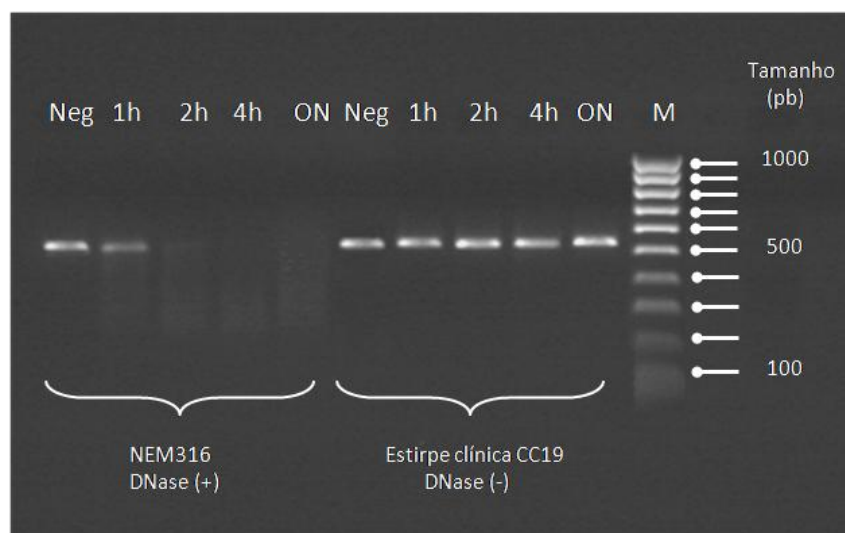
### 3.2 Avaliação Qualitativa e Semi-quantitativa da actividade das DNases

A produção de DNases foi avaliada de forma qualitativa em meio sólido *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), em todas as estirpes clínicas em estudo (humanas e bovinas) (Anexo II). A estirpe de referência O90R foi utilizada como controlo positivo. Foi observada descoloração do referido meio em 100% das estirpes de origem bovina e em 86% das estirpes de origem humana, o que foi considerado indicativo de hidrólise de DNA e consequente produção de nucleases extracelulares.

Nas estirpes de origem humana verificaram-se diferenças de produção de DNases (produção *versus* não produção) entre os diferentes serótipos/genótipos capsulares. Assim, todas as estirpes pertencentes aos tipos Ia, Ib, III-2 e IV, de colonização e infecção, foram produtoras, contrastando com os tipos II, III-1 e V, cuja percentagem de estirpes não produtoras foi de 82% a 88%, 48 a 59% e 90%, respectivamente. Embora o valor percentual de estirpes de infecção produtoras de DNases, pertencentes aos tipos II e III-1, ter sido ligeiramente superior ao das estirpes de colonização, não foi observada qualquer associação estatística entre produção e infecção ( $P > 0.05$ ).

A correlação dos dados acima descritos com as linhagens genéticas definidas por MLST permitiu relacionar o fenótipo não produtor com as estirpes dos tipos II/III-1/V pertencentes ao ST19 e STs derivados (SLV ou DLV), denominado por complexo clonal 19 (CC19), o qual se mostrou a única linhagem associada à não produção de DNases ( $P < 0.01$ ;  $0 \leq \text{Rácio de Odds} \leq 0.024$ , IC de 95%). No entanto, apesar do fenótipo não produtor estar associado ao CC19, foram igualmente identificadas estirpes produtoras de DNases pertencentes a esta linhagem.

Tendo em conta as limitações de interpretação/visualização nos ensaios em *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), todas as estirpes foram sujeitas a ensaios semi-quantitativos (Figura 3.1), por visualização da degradação do DNA em gel de agarose, os quais foram concordantes com os resultados obtidos pela técnica qualitativa. Por outro lado, foi possível constatar que a produção de DNases era variável entre os diversos genótipos, razão pela qual foi posteriormente avaliada com maior detalhe através de ensaios quantitativos.



**Figura 3.1** Ensaio semi-quantitativo da actividade das DNases em gel de agarose 1%, após incubação a 37°C de 1 µg de DNA bacteriano (pPCR do gene *atr*) com 10 µl de sobrenadante da cultura em quatro pontos horários: 1h, 2h, 4h e “overnight” (~17h), de forma a avaliar a digestão de DNA. O ensaio incluiu duas estirpes: estirpe representativa do fenótipo produtor (NEM316) e estirpe representativa do fenótipo não produtor (estirpe clínica pertencente ao CC19). Neg: Controlo Negativo (desprovido de sobrenadante); ON: “overnight” (~17h); M: Marcador de peso molecular (Hyperladder IV); DNase (+): Fenótipo produtor; DNase (-): Fenótipo não produtor.

**Tabela 3.1** Avaliação da actividade das DNases com base em ensaios qualitativos e semi-quantitativos, em estirpes de origem humana

				Percentagem de estirpes com produção de DNases; [STs de estirpes com produção de DNases]; CCs; (frequência)	
Genótipo Capsular	N.º total de estirpes	N.º total de estirpes de colonização	N.º total de estirpes de infecção	Colonização	Infecção
Ia	40	20	20	<b>100% (20/20)</b>	<b>100% (20/20)</b>
				[ST23 (17/20); ST144 (2/20); ST24 (1/20)]	[ST23 (19/20); ST24 (1/20)]
				<b>CC23 (20/20)</b>	<b>CC23 (20/20)</b>
Ib	20	10	10	<b>100% (10/10)</b>	<b>100% (10/10)</b>
				[ST8 (5/10); ST12 (2/10); ST1 (1/10); ST10 (1/10); ST563 (1/10)]	[ST10 (5/10); ST8 (4/10); ST12 (1/10)]
				<b>CC1 (2/10); CC12 (8/10)</b>	<b>CC12 (10/10)</b>

**Tabela 3.1** Avaliação da actividade das DNases com base em ensaios qualitativos e semi-quantitativos, em estirpes de origem humana (cont.)

Genótipo Capsular	N.º total de estirpes	N.º total de estirpes de colonização	N.º total de estirpes de infecção	Percentagem de estirpes com produção de DNases; [STs de estirpes com produção de DNases]; CCs; (frequência)	
				Colonização	Infecção
II	56	39	17	<b>82% (32/39)</b> [ST 28 (10/32); ST12 (8/32); ST44 (4/32); ST10 (3/32); ST2 (2/32); ST43 (1/32); ST154 (1/32); ST249 (1/32); ST347 (1/32); ST 472 (1/32)] <b>CC19 (17/32); CC12 (12/32); CC1 (2/32); CC23 (1/32)</b>	<b>88% (15/17)</b> [ST 12 (5/15); ST28 (4/15); ST19 (3/15); ST10 (1/15); ST22* (1/15); ST42 (1/15)] <b>CC19 (8/15); CC12 (6/15)</b>
III-1	58	29	29	<b>48% (14/29)</b> [ST19 (8/14); ST27 (2/14); ST106 (2/14); ST286 (1/14); ST369 (1/14)] <b>CC19 (14/14)</b>	<b>59% (17/29)</b> [ST19 (17/29)] <b>CC19 (17/17)</b>
III-2	58	29	29	<b>100% (29/29)</b> [ST17 (28/29); ST287 (1/29)] <b>CC17 (29/29)</b>	<b>100% (29/29)</b> [ST17 (29/29)] <b>CC17 (29/29)</b>
IV	13	10	3	<b>100% (10/10)</b> [ST196 (3/10); ST2 (2/10); ST1 (1/10); ST3 (1/10); ST162 (1/10); ST23 (1/10); ST10 (1/10)] <b>CC1 (7/10); CC23 (2/10); CC12 (1/10)</b>	<b>100% (3/3)</b> [ST66 (1/3); ST8 (1/10); ST23 (1/10)] <b>CC1 (1/3); CC23 (1/3); CC12 (1/3)</b>
V	40	20	20	<b>90% (18/20)</b> [ST2 (13/18); ST1 (5/18)] <b>CC1 (18/18)</b>	<b>90% (18/20)</b> [ST1 (15/18); ST2 (1/18); ST23 2/18)] <b>CC1 (16/18); CC23 (2/18)</b>

**Tabela 3.2** Avaliação da actividade das DNases com base em ensaios qualitativos e semi-quantitativos, em estirpes de origem bovina

Genótipo Capsular	N.º total de estirpes	N.º total de estirpes de colonização	N.º total de estirpes de infecção	Percentagem de estirpes com produção de DNases; [STs de estirpes com produção de DNases]; CCs; (frequência)
				Infecção
III-3	1	-	1	<b>100%</b> (1/1) [ST23 (1/1)]
V	14	-	14	<b>100%</b> (14/14) [ST2 (14/14)]
NT	45	-	45	<b>100%</b> (45/45) [ST2 (9/45); ST61 (16/45); ST554 (20/45)]

### 3.3 Avaliação Quantitativa da actividade das DNases

Com o intuito de verificar a eventual ausência de produção de DNases nas estirpes pertencentes ao CC19, procedeu-se à determinação da quantidade/percentagem de DNA remanescente em cada amostra, após a incubação de uma quantidade de DNA conhecida com o sobrenadante de cada cultura *S. agalactiae* recolhida durante a fase estacionária de crescimento, a 37°C, mais precisamente em 4 pontos horários (1h, 2h, 4h e 17h) (Figura 3.2). Para tal, foram seleccionadas estirpes CC19 representativas do fenótipo não produtor de DNases, quer de colonização, quer de infecção, com cápsula dos tipos II, III-1 e V. Foram avaliadas em simultâneo, estirpes produtoras de DNases do mesmo genótipo (II/CC19 e III-1/CC19), com excepção do serótipo capsular V, dado não terem sido identificadas estirpes V/CC19 produtoras de DNases nos ensaios qualitativos e semi-quantitativos. Foram avaliadas estirpes, de colonização e infecção, pertencentes a outros complexos clonais, aqui designadas como estirpes “*outgroup*”, respeitantes aos genótipos III-2/ST17, Ia/ST23, V/ST1 e *New-2*/ST61, sendo que esta última corresponde a uma estirpe de origem bovina, evidenciada como ancestral do clone ST17 (Bisharat *et al.*, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2011). Por fim, foram incluídas as estirpes de referência, NEM316, 2603V/R e COH1, como controlos.

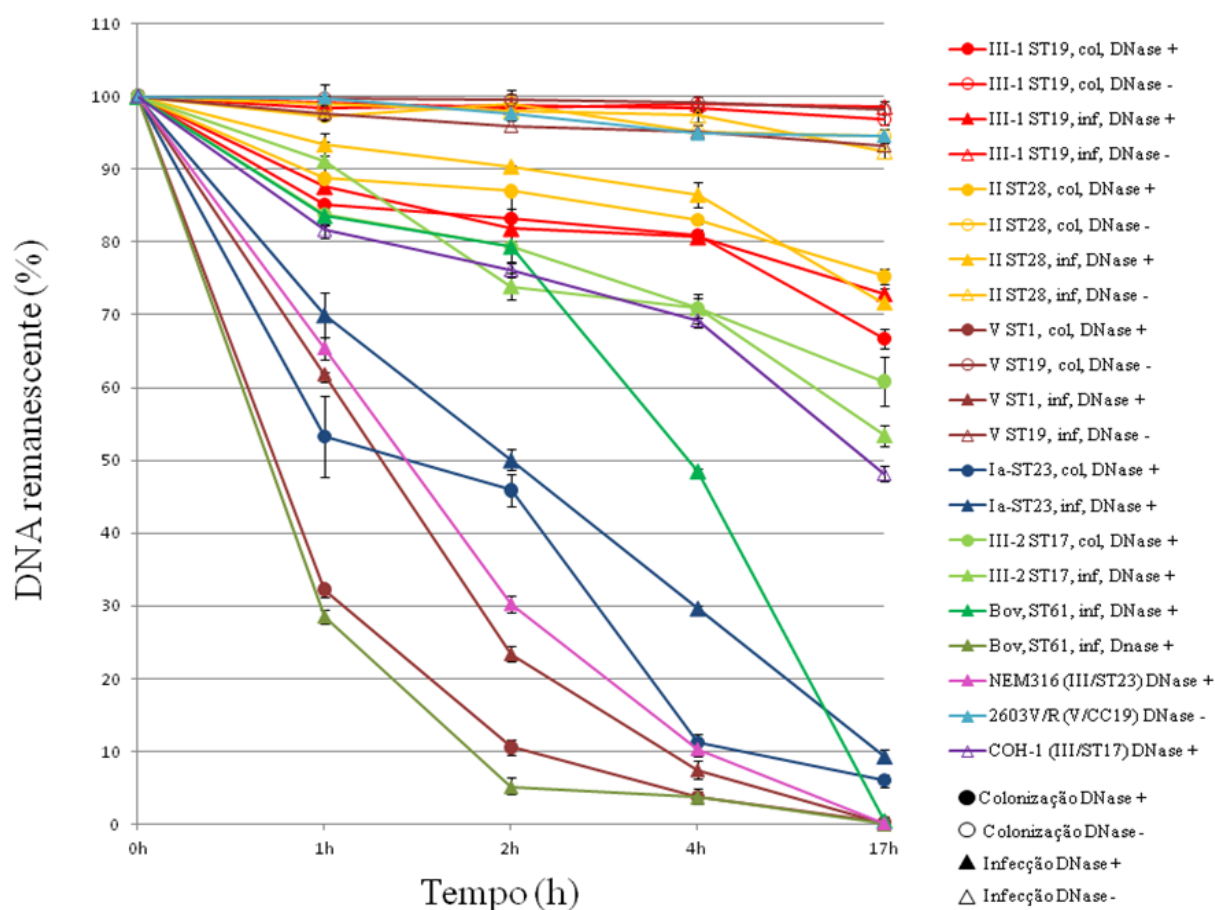
A análise da actividade das DNases em estirpes CC19, definidas com o fenótipo não produtor pelos ensaios anteriores, permitiu verificar que o valor percentual da quantidade de DNA permaneceu

idêntico e próximo a 100% (1 µg) mesmo após 17h de incubação com sobrenadante de culturas das referidas estirpes. De facto, foi detectada uma quantidade de DNA remanescente compreendida entre 94 e 99%, cujo intervalo está compreendido na gama de valores obtidos para o controlo negativo (sem adição de sobrenadante; 94 a 100%). Estes dados reflectem uma actividade nula ou residual nestas estirpes, o que confirmou a associação do fenótipo não produtor ao CC19.

Para as estirpes CC19 produtoras de DNases, as quais foram avaliadas em simultâneo, verificou-se uma degradação de DNA no período de 17h compreendida entre 20 e 30%, o que se considerou como indicativo de uma produção pouco acentuada de DNases.

De um modo geral, todas as estirpes estudadas como “*outgroup*” apresentaram produção de DNases, tendo sido possível observar uma diferença substancial entre os diferentes genótipos estudados. Assim, as estirpes ST17 foram as que apresentaram menor produção de DNases, tendo sido registado um valor de DNA remanescente de cerca de 55%, contrastando com a elevada produção apresentada pelas estirpes dos genótipos V/ST1 e *New-2*/ST61 (degradação de DNA próxima de 100%).

A análise da actividade das DNases nos três grupos de estirpes clínicas (CC19 não produtoras, CC19 produtores e “*outgroup*”), permitiu constatar a existência de perfis idênticos de degradação de DNA entre as 0 e as 17h, entre estirpes de colonização e infecção pertencentes ao mesmo genótipo/fenótipo, à excepção das estirpes ST61 para as quais se observaram diferentes perfis de produção. As estirpes de referência, NEM316, COH1 e 2603V/R apresentaram perfis de degradação de DNA semelhantes aos obtidos para as estirpes clínicas da mesma linhagem (CC23, CC17, CC19, respectivamente). É de salientar a ausência/reduzida produção de DNases (95% de DNA remanescente, após 17h) pela estirpe de referência 2603V/R, corroborando a associação entre o fenótipo não produtor e o CC19.



**Figura 3.2** Ensaios quantitativos da acção das DNases representativos da evolução da actividade diferencial das estirpes ao longo do tempo (0h – 17h). O ensaio foi realizado em duplicado, sendo apresentados os valores médios. As barras de erro associado são indicativas do desvio padrão.

### 3.4 Subcaracterização das estirpes CC19

Com o intuito de proceder à identificação de determinantes genéticos associados à produção/não produção de DNases, todas as estirpes CC19 (n= 97; 55 estirpes de colonização e 42 estirpes de infecção), foram sujeitas a caracterização molecular e fenotípica adicional (MLVA, resistência a antimicrobianos, detecção de elementos móveis na região inter-génica *scpB-lmb*, pesquisa dos genes *alp* e PFGE).

### 3.4.1 MLVA

Com base na técnica MLVA foram identificados dois perfis/genótipos para as estirpes CC19. Todas as estirpes CC19 produtoras e não produtoras, de colonização e infecção, apresentaram o perfil 33 (3,3,3,5,0,2) à exceção das estirpes ST28, nas quais foi identificado o perfil 32 (3,3,1,5,0,2).

### 3.4.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

Nenhuma estirpe CC19 apresentou resistência à penicilina (CMI entre 0.032 e 0.125 µg/ml) e vancomicina (CMI entre 0.25 e 1 µg/ml). Relativamente aos macrólidos, as estirpes CC19 de infecção não revelaram qualquer resistência. Dezassete das 55 estirpes CC19 de colonização (31%) revelaram resistência à eritromicina, as quais pertenciam aos genótipos III-1 (n=16) e II (n=1). Nove destas 17 estirpes (16.4% do total de estirpes CC19 de colonização) apresentaram resistência simultânea à eritromicina e clindamicina. Através de amplificação por PCR foi possível a detecção/identificação dos genes responsáveis pelas referidas resistências. Nas nove estirpes que apresentaram resistência simultânea à eritromicina e clindamicina (CMI  $\geq$  256 µg/ml) foi detectada a presença do gene *ermB*. Nas estirpes que apenas foram resistentes à eritromicina, CMI entre 2 e 6 µg/ml, em oito foi detectado o gene *ermA* e numa estirpe o gene *mefA*.

A correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e a produção de DNases permitiu constatar que todas as estirpes CC19 de colonização resistentes aos macrólidos não produzem DNases. Contudo, esta situação não se verifica para a colecção de estirpes de infecção, na qual existem estirpes não produtoras de DNases susceptíveis à eritromicina.

### 3.4.3 Detecção de elementos móveis (*GBSi1*, *IS1548*) na região intergénica *scpB-lmb*

A presença dos elementos móveis *GBSi1* e *IS1548* na região intergénica *scpB-lmb* foi avaliada em todas as estirpes CC19 de colonização e infecção, produtoras e não produtores de DNases, através de amplificação por PCR. A maioria das estirpes pertencentes ao CC19 (n=76; 78%) apresentaram um amplicão de 1600 pb, indicativo da presença do elemento móvel *IS1548*; nas estirpes pertencentes ao ST28 (n=21; 22%) foi detectado um amplicão na ordem dos 2200 pb, o qual corresponde à presença do elemento móvel *GBSi1*.

### 3.4.4 Pesquisa dos genes pertencentes à família de proteínas de superfície Alp

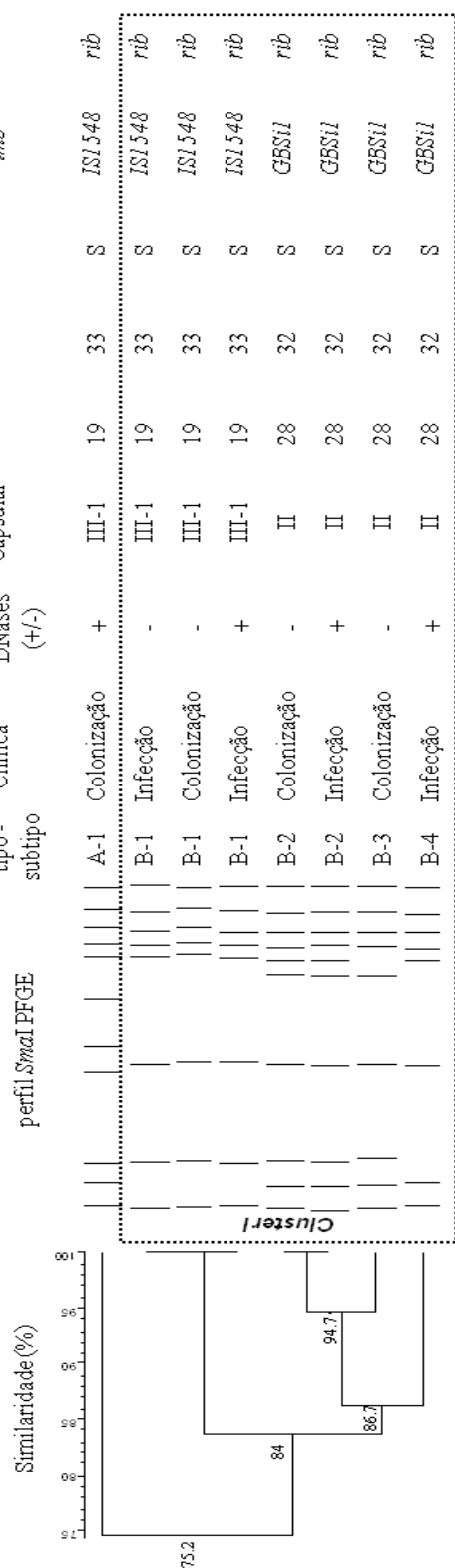
A pesquisa dos genes *alp* foi efectuada em todas as estirpes CC19 de colonização e infecção, produtoras e não produtores de DNases. Das 97 estirpes pertencentes ao CC19, todas apresentaram a proteína de superfície *rib* (genótipos capsulares II e III-1), com excepção de uma estirpe de infecção pertencente ao serótipo capsular V, não produtora de DNases, para a qual foi detectada a presença do gene *alp3*.

### 3.4.5 PFGE

A técnica de PFGE foi realizada com vista a avaliar a eventual clonalidade das estirpes pertencentes ao CC19 não produtoras de DNases. Desta forma, foram seleccionadas oito estirpes representativas deste complexo clonal, nomeadamente quatro estirpes CC19 produtoras (ST19, n=2; ST28, n=2) e quatro não produtoras (ST19, n=2; ST28, n=2), sendo cada par constituído por uma estirpe de colonização e outra de infecção.

A técnica de PFGE permitiu a identificação de cinco padrões de restrição de DNA cromossómico (perfis com 8 a 12 bandas) para as estirpes de *S. agalactiae* analisadas, correspondendo a dois tipos de PFGE, designados por A e B (Figura 3.3). O tipo A incluiu apenas uma estirpe, de colonização, produtora de DNases e com o genótipo III-1/ST19/33/IS1548/*rib*. As restantes sete estirpes analisadas pertenceram ao tipo B, o qual apresentou quatro subtipos de PFGE, constituindo um grupo clonal (“cluster I”, coeficiente de similaridade  $\geq 84\%$ ). É de referir que o subtipo B-1 incluiu apenas estirpes III-1/ST19 enquanto as estirpes II/ST28 corresponderam aos subtipos B-2 a B-4. Com base nos resultados apresentados na Figura 3.3, não foi possível discriminar as estirpes CC19 relativamente à produção de DNases e à origem clínica. Por exemplo, as três estirpes pertencentes ao tipo B-1 (coeficiente de similaridade de 100%) apresentaram os mesmos marcadores epidemiológicos estudados (III-1/ST19/33/IS1548/*rib*), contudo diferiram no que diz respeito à origem clínica e à produção de DNases.





**Figura 3.3** Dendrograma construído com base nos padrões de *Sma*I obtidos por PFGE em *S. agalactiae*.

As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: coeficiente de semelhança de “Dice”, método de agrupamento “UPGMA” (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*), otimização de 0.0% e tolerância de 1.5%. (+): Fenótipo produtor de DNases; (-): Fenótipo não produtor de DNases; S - susceptibilidade a antimicrobianos.

## 4 Discussão

O presente estudo teve por base a avaliação da actividade das DNases, bem como a correlação com o genótipo, origem clínica e hospedeiros em estudo, de forma a encontrar informações significativas e esclarecedoras acerca do papel biológico das DNases na patogénese de *S. agalactiae*. Este microorganismo comensal e patogénico de humanos e bovinos continua a ser considerado a principal causa mundial de infecções invasivas no período perinatal e neonatal (Lindahl *et al.*, 2005; Schuchat, 1998, 2000) surgindo também associado a infecção emergente na população adulta (Farley, 2001; Henry, 1996; Phares *et al.*, 2008). Desta forma, é cada vez mais importante a realização de estudos com vista a conhecer melhor os seus mecanismos de patogénese/virulência, características fenotípicas e genotípicas das estirpes circulantes, bem como a sua distribuição na população. O papel da actividade enzimática das DNases extracelulares na patogénese bacteriana continua por esclarecer (Sumbly *et al.*, 2005). Publicações anteriores apontam para a importância destas nucleases na evasão ao sistema imunitário em *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus* (Beiter *et al.*, 2006; Berends *et al.*, 2010; Sumbly *et al.*, 2005), no entanto, apesar do elevado número de estirpes *S. agalactiae* produtoras de DNases, (Ferrieri *et al.*, 1975, 1980) ainda não existe nenhuma evidência directa que as implique na patogénese desta bactéria.

### 4.1 Caracterização molecular de *S. agalactiae*

No presente trabalho, foram estudadas apenas estirpes com tipos Ia a V, dada a sua elevada prevalência (80 a 90%) (Brimil, 2006; Florindo *et al.*, 2010; Hickman *et al.*, 1999). Estudos realizados na Europa e EUA, documentaram os tipos Ia, II, III e V como os mais prevalentes em colonização de parturientes por *S. agalactiae* (Brimil, 2006; Florindo *et al.*, 2010; Hickman *et al.*, 1999), doença neonatal invasiva (Bergseng *et al.*, 2009; Bohnsack *et al.*, 2008; Imperi *et al.*, 2011; Kunze *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2007; Phares *et al.*, 2008; Poyart *et al.*, 2008) e doença na população adulta (Farley, 2001; Huber *et al.*, 2011; Lambertsen *et al.*, 2010; Skoff *et al.*, 2009; Tazi *et al.*, 2011). Alguns autores (Maione *et al.*, 2005; Weisner *et al.*, 2004) consideram que a prevalência dos referidos tipos capsulares justifica que sejam os escolhidos para a constituição de uma vacina, já que seria teoricamente eficaz na cobertura de 85% dos casos de infecção por *S. agalactiae* do recém-nascido. Nos últimos anos, tem-se vindo a constatar a emergência do tipo IV, em particular nos EUA (Diedrick *et al.*, 2010) o qual foi por esta razão incluído no presente estudo. A serologia capsular é o método clássico utilizado na tipagem de *S. agalactiae* em estudos epidemiológicos; no entanto, não permite determinar a clonalidade das estirpes devido ao número de casos de não tipáveis (~11%) (Davies *et al.*, 2001), bem como devido ao fenómeno “capsular switching” (Davies *et al.*, 2004; Jones *et al.*,

2003; Luan *et al.*, 2005). Estudos recentes (Martins *et al.*, 2010) sugerem que o fenómeno “*capsular switching*” por transferência horizontal de genes não é tão frequente como anteriormente sugerido por outros autores (Davies *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2008), considerando os erros provenientes da serotipagem como a principal razão para a elevada estimativa de casos de “*switching*”. Desta forma, é importante a realização da tipagem capsular por análise do polimorfismo dos *loci* capsulares *cps*, de forma a ultrapassar as limitações dos métodos serológicos.

Com o intuito de proceder à identificação das linhagens genéticas das estirpes em análise, recorreu-se à técnica MLST, a qual tem sido frequentemente utilizada como método padrão para a determinação da estrutura populacional em *S. agalactiae* (Bisharat *et al.*, 2005; Cieslewicz *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2003, 2006; Lin *et al.*, 2006; Luan *et al.*, 2005). No que diz respeito às relações verificadas entre tipos capsulares e complexos clonais, os resultados obtidos correspondem ao esperado, uma vez que estas associações já tinham sido identificadas em estudos anteriores (Fluegge *et al.*, 2011; Gherardi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Tazi *et al.*, 2010). Foram identificadas quatro linhagens genéticas principais Ia/CC23, III-1/CC19, III-2/CC17 e V/CC1, o que indica a elevada clonalidade da estrutura populacional das estirpes de *S. agalactiae*. Foi possível identificar duas linhagens genéticas associadas ao tipo capsular III. Desta forma, tal como descrito em estudos anteriores é possível concluir que o clone hipervirulento ST17, o qual é responsável pela grande maioria das infeções neonatais, está associado ao subtipo capsular III-2; já o clone ST19 surgiu predominantemente associado ao subtipo III-1, o qual foi principalmente associado a casos de colonização por *S. agalactiae* (Fluegge *et al.*, 2011; Gherardi *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Tazi *et al.*, 2010). Apesar da importância da técnica de MLST na identificação das linhagens genéticas de *S. agalactiae*, esta não permitiu a identificação de linhagens/clones associados ao fenótipo produtor e/ou não produtor de DNases. De facto, o MLST é geralmente aceite como método padrão para a genotipagem de *S. agalactiae* mas, estudos publicados por Sorensen e co-autores (Sorensen *et al.*, 2010), demonstraram a sua incapacidade na identificação de populações clinicamente distintas pertencentes ao complexo clonal 23, revelando que o número de *loci* seleccionados é insuficiente para a distinção destas linhagens. Para além disso, o facto dos genes utilizados na análise por MLST estarem mapeados no cromossoma em regiões próximas e não em locais dispersos, pode levar a análises filogenéticas erróneas (Sorensen *et al.*, 2010).

## 4.2 Avaliação da actividade das DNases

No que diz respeito aos ensaios realizados com o intuito de avaliar a actividade das DNases, foi possível concluir que a maioria das estirpes de *S. agalactiae* produz DNases, ou seja, verificou-se que 100% das estirpes de origem bovina e 86% das estirpes de origem humana são produtoras de nucleases extracelulares. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os anteriormente

publicados por Ferrieri e co-autores (Ferrieri *et al.*, 1980) os quais obtiveram exactamente 86% de estirpes produtoras de DNases de origem humana; no entanto, ainda não existem estudos documentados na literatura sobre a actividade das DNases em estirpes de *S. agalactiae* de origem bovina, não sendo portanto possível o estabelecimento de comparações com os resultados obtidos no presente estudo para estas estirpes (100% de estirpes produtoras de DNases). Um aspecto importante de salientar é o facto da produção de DNases variar consoante os capsulares e as linhagens genéticas. A percentagem de estirpes com o fenótipo não produtor foi encontrada nos tipos capsulares II, III-1 e V, sendo que esta foi restrita a uma única linhagem genética, CC19. Embora se pudesse especular sobre a eventual existência de uma maior produção de DNases para as estirpes de infecção, devido ao seu potencial patogénico e portanto, à maior necessidade de aquisição de factores de virulência, não foram verificadas diferenças entre estirpes de colonização e infecção, o que sugere que a produção de nucleases extracelulares é independente da origem clínica das estirpes.

### 4.3 Subcaracterização das estirpes CC19 de *S. agalactiae*

Diversos genes têm vindo a ser sugeridos como potenciais marcadores de virulência na patogénese de *S. agalactiae*. Desta forma, procedeu-se à subcaracterização genética das estirpes pertencentes ao CC19, através da caracterização de um painel de marcadores genéticos, com base em técnicas de elevado poder discriminatório, de forma a encontrar evidências genéticas que pudessem justificar os diferentes fenótipos de produção de DNases.

O método MLVA constituiu uma das técnicas de eleição para a subcaracterização das estirpes CC19 devido ao seu elevado poder discriminatório. As especificidades dos VNTRs para cada linhagem filogenética sugerem a implicação dos mesmos na adaptação de *S. agalactiae* ao seu ambiente, bem como na virulência, sendo desta forma justificada a utilização desta técnica no presente estudo. No entanto, a análise do polimorfismo das repetições em *tandem* nos diversos *loci*, apenas permitiu definir uma distribuição clonal das estirpes bastante semelhante à obtida pela técnica de MLST, tal como anteriormente havia sido descrito por Haguenoer e co-autores (Haguenoer *et al.*, 2011). Estes autores definem a técnica de MLVA como um método de poder discriminatório superior ao MLST, o qual permite a distinção entre estirpes pertencentes a linhagens homogéneas. Assim, apesar da técnica MLVA ser descrita como uma ferramenta valiosa para a distinção de estirpes em inúmeras espécies bacterianas (Pourcel *et al.*, 2009; Puopolo e Madoff, 2003), tendo como alvo diversos marcadores génicos (genes envolvidos no metabolismo, genes associados à virulência e ilhas genómicas) (Tettelin *et al.*, 2005), tal não aconteceu no presente trabalho, já que a mesma não permitiu a separação das estirpes CC19 em clones associados à produção ou à não produção de DNases extracelulares.

Um aspecto interessante relativamente aos testes de susceptibilidade a antimicrobianos incidiu no facto das estirpes CC19 resistentes aos macrólidos apresentarem o fenótipo não produtor de DNases. No entanto, este aspecto apenas foi verificado para as estirpes de colonização e, para além disso, constatou-se a existência de estirpes não produtoras de DNases susceptíveis aos macrólidos, não sendo assim possível estabelecer uma associação entre fenótipo não produtor de DNases e resistência a antimicrobianos.

No presente trabalho, as estirpes pertencentes ao CC19 foram agrupadas em dois “clusters”, consoante os elementos móveis presentes na região intergénica *scpB-lmb*. Assim, as estirpes CC19 (de colonização ou de infecção) pertencentes ao subtipo III-1 (ST19 e STs derivados) apresentaram o elemento móvel *IS1548*, enquanto que as estirpes pertencentes ao tipo II (ST28) foram caracterizadas pela presença do *GBS11*. Os resultados obtidos estão de acordo com a hipótese anteriormente colocada por Bohnsack e co-autores (Bohnsack *et al.*, 2008), segundo a qual estes dois “clusters” parecem formar duas linhagens distintas mas relativamente homogéneas, as quais poderão apresentar diferenças a nível da expressão de factores de virulência. Segundo Safadi e co-autores (Safadi *et al.*, 2010) a presença de elementos móveis não influenciaria a expressão do gene *scpB* mas a expressão do gene *lmb* aumentaria significativamente nas estirpes que apresentam o elemento móvel *IS1548* na região intergénica *scpB-lmb*. Desta forma, as estirpes ST19 poderão ter maior capacidade de adesão à laminina de hospedeiros de origem humana. Os elementos móveis constituem uma importante fonte de plasticidade genética para os microorganismos, na medida em que influenciam a sua evolução e adaptação através da recombinação e transferência horizontal de genes, bem como os mecanismos de virulência da bactéria através da sua influência na expressão génica (Brochet *et al.*, 2006). Desta forma, a presença de elementos móveis no genoma de *S. agalactiae* sugere que a transferência horizontal de genes poderá ter um importante papel na diversificação genómica e na emergência de clones virulentos (Domelier *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2002; Héry-Arnaud *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que as patologias causadas por *S. agalactiae* são na sua maioria originadas por um conjunto limitado de linhagens clonais e, assim sendo, os elementos móveis surgem como marcadores genéticos para linhagens genéticas particulares (Bisharat *et al.*, 2005; Bohnsack *et al.* 2008; Musser *et al.*, 1989; Quentin *et al.*, 1995). Tal como referido por Safadi e co-autores, a região intergénica *scpB-lmb* poderá ser essencial para a colonização ou infecção em humanos (Franken *et al.*, 2001; Gleich-Theurer *et al.*, 2009), no entanto, apesar dos elementos móveis serem importantes marcadores de linhagens genéticas, mais uma vez, as linhagens evidenciadas não se relacionam com a presença/ausência de produção de DNases, sendo que em ambas as linhagens CC19 indicadas são visíveis fenótipos de produção e não produção.

A pesquisa dos genes que codificam para as proteínas de superfície Alp foi efectuada em todas as estirpes CC19, tendo sido constatada a presença do gene *rib* em todas as estirpes pertencentes aos tipo II e sub-tipo III-1. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Gherardi e co-autores (Gherardi *et al.*, 2007), os quais referem que os tipos II e III apresentam frequentemente o gene *rib*.

Contudo, e ao contrário do que foi descrito na referida publicação (Gherardi *et al.*, 2007), todas as estirpes CC19 pertencentes ao tipo capsular V apresentaram o gene *rib*, à exceção de uma única estirpe que apresentou o gene *alp3*, o qual de acordo com os mesmos autores, é o mais frequentemente associado ao tipo V (Gherardi *et al.*, 2007). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os estudos de Mavenyengwa e colaboradores (Mavenyengwa *et al.*, 2008) que obtiveram uma elevada frequência da proteína Rib (75.8%) nas estirpes do tipo capsular V, em contraste com a baixa prevalência da proteína Alp3 (6.8%). Sendo a presença da proteína Rib considerada rara nas estirpes pertencentes ao tipo V (Gherardi *et al.*, 2007; Lindahl *et al.*, 2005), Mavenyengwa e colaboradores (Mavenyengwa *et al.*, 2008) defendem que este aspecto possa estar eventualmente relacionado com o facto de nestas estirpes, a proteína Rib ter ocupado a posição e, possivelmente, a função biológica realizada pela proteína Alp3, sendo tentador especular se este aspecto será reflexo da existência de diferenças evolutivas entre as linhagens de *S. agalactiae*. De facto, tal como descrito em vários estudos (Kong *et al.*, 2002; Lindahl *et al.*, 2005), as proteínas Alp encontram-se fortemente associadas aos tipos capsulares, não tendo sido possível verificar qualquer associação destas proteínas com os fenótipos de produção/não produção de DNases, nem com as linhagens pertencentes ao CC19, mas sim com os tipos expressos pelas estirpes.

Relativamente à análise realizada por PFGE, verificou-se a existência de clonalidade entre as estirpes CC19 produtoras e não produtoras de DNases, tendo sido observada pouca variação entre os padrões de restrição obtidos para as estirpes pertencentes ao referido complexo clonal. Foi definido um único “cluster” (similaridade  $\geq 84\%$ ), dentro do qual algumas estirpes apresentaram o mesmo perfil PFGE (100% de similaridade), sendo que apenas uma estirpe não foi incluída no referido “cluster”. Algumas estirpes com os mesmos marcadores epidemiológicos estudados (III-1/ST19/33/IS1548/*rib*) e o mesmo perfil de PFGE (100% semelhança), apenas diferiram na origem clínica e na produção de DNases. Enquanto que também se verificaram casos em estirpes pertencentes à mesma origem clínica e com o mesmo fenótipos de produção de DNases, apresentaram marcadores epidemiológicos (incluindo perfil de PFGE) diferentes. Desta forma, não foi possível a obtenção de perfis de PFGE que pudessem eventualmente separar as estirpes CC19 em clones associados à presença/ausência de produção de DNases extracelulares.

#### 4.4 Conclusões/Perspectivas futuras

O presente estudo permitiu demonstrar que o facto de uma estirpe pertencer ao CC19 aumenta a sua probabilidade de não produzir DNases, no entanto, não foi possível encontrar evidências que possam justificar os diferentes fenótipos de produção de DNases expressos pelas estirpes. Foram identificadas algumas características genéticas que parecem ser típicas do referido complexo clonal, tais como: 1) associação com os tipos capsulares II, III-1 e V; 2) perfil de MLVA 32 ou 33; 3)

elementos móveis *GBS* ou *IS1548*; e 4) proteínas de superfície Alp3 ou Rib. A análise comparativa entre os marcadores epidemiológicos utilizados não permitiu o estabelecimento de correlações com a produção de DNases; estudos recentes (Sorensen *et al.*, 2010) alertam para esta dificuldade, dado não terem conseguido prever a virulência das estirpes com base em marcadores epidemiológicos. Segundo Sorensen e co-autores (Sorensen *et al.*, 2010) não existe nenhum modelo filogenético único para avaliar a evolução de *S. agalactiae*, cujo genoma é resultado de múltiplos eventos de recombinação, no decurso dos quais alguns clones emergiram e se disseminaram globalmente. Assim, de acordo com estes autores, *S. agalactiae* será composto por uma população bastante heterogénea, dotada de um conjunto quase ilimitado de genes, de acordo com o conceito de “*open pan-genome*”, descrito por Tettelin e colaboradores (Tettelin *et al.*, 2005). Tal situação poderá justificar a falta de correlação entre tipo capsular, genótipo, tropismo e outras propriedades, como resultado de recombinação frequente, resultando na estrutura genómica dinâmica descrita por Tettelin e Brochet (Brochet *et al.*, 2006, 2008; Tettelin *et al.*, 2005). Desta forma, apesar de alguns marcadores epidemiológicos serem importantes para definir “*clusters*” dentro da população de *S. agalactiae*, a relação entre estes e a clínica pode não ser concordante (Lin *et al.*, 2009). Assim, as diferenças entre a distribuição por tipos e genótipos é ilustrativa do grau de heterogeneidade genética da população de *S. agalactiae*, sendo que esta diversidade se reflecte na dificuldade em determinar as relações existentes entre genótipos específicos de *S. agalactiae* e as suas manifestações clínicas (Lin *et al.*, 2009). Estas evidências justificam a premente necessidade de identificar novos genes que possam estar envolvidos na virulência de *S. agalactiae*, bem como marcadores de virulência de elevado poder discriminatório, de modo a aprofundar o estudo desta bactéria relativamente ao risco de doença associado (Lin *et al.*, 2009).

Uma das limitações do presente estudo foi a selecção de uma única estirpe representativa de cada tipo capsular (de colonização e infecção) aquando da realização dos ensaios quantitativos da actividade das DNases, sendo por isso crucial aumentar a amostragem em estudos futuros. Relativamente às estirpes de origem bovina, apesar dos diversos tipos/sub-tipos capsulares até agora descritos (Rato *et al.*, 2012) terem sido incluídos no presente estudo, a maioria eram genótipos novos/ainda não identificados em estirpes de origem humana. Por outro lado, todas as estirpes de origem bovina estavam associadas a episódios de mastite subclínica e não a colonização, o que constituiu uma limitação, e seria por isso interessante a realização de um estudo que incluísse estirpes de origem animal com diferentes genótipos e origens clínicas de modo a ser possível o estabelecimento de mais comparações relativamente às estirpes de origem humana.

Apesar das técnicas utilizadas no presente estudo serem consideradas adequadas para a caracterização de *S. agalactiae*, cada metodologia permitiu apenas a avaliação de porções do genoma. De facto, uma importante limitação na investigação do eventual papel das DNases na patogénese de *S. agalactiae* encontra-se relacionada com a falta de conhecimento sobre os genes que codificam e regulam estas enzimas. O fenótipo não produtor poderia ser sugestivo da ausência de genes codificantes das DNases; no entanto, dados preliminares (ainda não publicados) de um colaborador do

laboratório de acolhimento do INSA, identificaram dois genes na estirpe de referência 2603V/R (V/CC19/não produtora de DNases), os quais são expressos, mesmo sendo esta estirpe caracterizada pela ausência de produção de DNases. Assim, pode presumir-se que o facto das estirpes apresentarem diferentes fenótipos de produção de DNases possa estar eventualmente relacionado com mecanismos de regulação génica.

Em termos de perspectivas futuras, considera-se que seria importante a pesquisa dos genes codificantes das DNases e a análise da sua sequência nucleotídica (identificação de polimorfismos/mutações); a realização de uma análise comparativa genómica e transcriptómica, que envolvesse estirpes de referência e estirpes clínicas CC19 de *S. agalactiae*, produtoras e não produtoras de DNases, com vista à identificação de características genómicas “associadas” aos fenótipos de produção/não produção de DNases; estudos de produção e estabilidade do mRNA; estudos de proteómica; bem como, estudos de regulação, de forma a contribuir para a abertura de novos caminhos nos estudos de patogenia e evolução de *S. agalactiae*.





## 5. Bibliografia

Adderson, E.E., Takahashi, S., Wang, Y., Armstrong, J., Miller, D.V., Bohnsack, J.F. 2003. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity* 71: 6857-6863.

Amin, A., Abdulrazzaq, Y.M., Uduman, S. 2002. Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. *The Journal of Infection* 45: 42-46.

Baker, C. J., Barrett, F.F., Gordon, R.C., Yow, M.D. 1973. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *The Journal of Pediatrics* 82: 724-729.

Baron, M.J., Kasper, D.L. 2005. Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2325-7.

Barton, L.L, Feigin, R.D., Lins, R. 1973. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *The Journal of Pediatrics* 82: 719-723

Beckmann, C., Waggoner, J.D., Harris, T.O., Tamura, G.S., Rubens, C.E. 2002. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infection and Immunity* 70: 2869-2876.

Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., Henriques-Normark, B. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current Biology* 16: 401-407.

Benson, J. A., Flores, A.E., Baker, C.J., Hillier, S.L., Ferrieri, P. 2002. Improved methods for typing nontypeable isolates of group B streptococci. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 37-42.

Berends, E.T., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., von Köckritz-Blickwede, M. 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of Innate Immunity* 2: 576-86.

- Bergseng, H., Afset, J.E., Radtke, A., Loeseth, K., Lyng, R.V., Rygg, M., Bergh, K. 2009. Molecular and phenotypic characterization of invasive group B streptococcus strains from infants in Norway 2006-2007. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 1182-5.
- Berner, R., Schumacher, R.F., Bartelt, S., Forster, J., Brandis, M. 1998. Predisposing conditions and pathogens in bacteremia in hospitalized children. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases* 17: 337-340.
- Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Peto, T., Jones, N. 2004. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2161-7.
- Bisharat, N., Jones, N., Marchaim, D., Block, C., Harding, R.M., Yagupsky, P., Peto, T., Crook, D.W. 2005. Population structure of group B streptococcus from a low-incidence region for invasive neonatal disease. *Microbiology* 151:1875-81.
- Blowey, R., Edmondson, P. 1995. Mastitis control in dairy herds. Ipswich. Farming Press.
- Blumberg, H.M., Stephens, D.S., Modansky, M., Erwin, M., Elliot, J., Facklam, R.R., Schuchat, A., Baughman, W., Farley, M.M. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *Journal of Clinical Microbiology* 173: 365-73.
- Bohnsack, J.F., Whiting, A.A., Martinez, G., Jones, N., Addrson, E.E., Detrick, S., Blaschke-Bonkowsky, A.J., Bisharat, N., Gottschalk, M. 2004. Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. *Emerging Infectious Diseases* 10: 1412-9.
- Bohnsack, J.F., Whiting, A., Gottschalk, M., Dunn, D.M., Weiss, R., Azimi, P.H., Philips, J.B., Weisman, L.E., Rhoads, G.G., Lin, F.Y. 2008. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. *Journal of clinical microbiology* 46: 1285-91.
- Brandt, C.M., Spellerberg, B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. 2009. *Clinical Infectious Disease* 49: 766-72.
- Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs, U., Kuhn, M., Lütticken, R., Spellerberg, B. 2006. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 39-44.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-5.
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews microbiology* 8: 577-82.
- Brochet, M., Couvé, E., Zouine, M., Vallaey, T., Rusniok, C., Lamy, M.C., Buchrieser, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., Poyart, C., Glaser, P. 2006 Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes and Infection* 8: 1227–1243.
- Brochet, M., C. Rusniok, E. Couve, S. Dramsi, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, and P. Glaser. 2008. Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 105: 15961–15966.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2010. *Biology of Microorganisms* 13th Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Brueggemann, A.B., Peto, T.E., Crook, D.W., Butler, J.C., Kristinsson, K.G., Spratt, B.G. 2004. Temporal and geographic stability of the serogroup-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in children. *The Journal of Infectious Diseases* 190: 1203-11
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W.D. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 560-602.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.
- Caliot, É., Dramsi, S., Chapot-Chartier, M.P., Courtin, P., Kulakauskas, S., Péchoux, C., Trieu-Cuot, P., Mistou, M.Y. 2012. Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. *PLoS Pathogens* 8: e1002756.
- Canchaya, C., Desiere, F., McShan, W.M., Ferretti, J.J., Parkhill, J., Brüssow, H. 2002. Genome analysis of an inducible prophage and prophage remnants integrated in the *Streptococcus pyogenes* strain SF370. *Virology* 302: 245-58.

Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: A public health perspective. *MMWR* 45:1-24.

Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. 51: 1-32.

Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Early-onset and late-onset neonatal group B streptococcal disease-United States, 1996-2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54: 1205-1208.

Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC. 59: 1-23.

Cheng, Q., Stafslie, D., Purushothaman, S.S., Cleary, P. 2002. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infection and Immunity* 70: 2408–2413.

Chmouryguina, I., Suvorov, A., Ferrieri, P., Cleary, P.P. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infection and Immunity* 64: 2387-90.

Chu, Y. W., Tse, C., Tsang, G. K., So, D. K., Fung, J. T., Lo, J.Y. 2007. Invasive group B *Streptococcus* isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong. *The Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 60:1407–1409.

Cieslewicz, M.J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Madan, A., Rodrigues, S., Fahey, J., Wessels, M.R., Rubens, C.E. 2005. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infection and Immunity* 73: 3096-103.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Eight Edition 26: 5-32.

Cropp, C.B., Zimmerman, R.A., Jelinkova, J., Auernheimer, A.H., Bolin, R.A., Wyrick, B.C. 1974. Serotyping of group B streptococci by slide agglutination fluorescence microscopy, and microimmunodiffusion. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 84: 594-603.

Dahesh, S., Hensler, M.E., Van Sorge, N.M., Gertz, R.E., Schrag, S., Nizet, V., Beall, B.W. 2008. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 2915-8.

- Davies, H.D., Jones, N., Whittam, T.S., Elsayed, S., Bisharat, N., Baker, C.J. 2004. Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 1097-102.
- De Azavedo, J.C., McGavin, M., Duncan, C., Low, D.E., McGeer, A. 2001. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 3504-8.
- Deng, L., Kasper, D.L., Krick, T.P., Wessels, M.R. 2000. Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B Streptococcus. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7497–7504.
- Diedrick, M.J., Flores, A.E., Hillier, S.L., Creti, R., Ferrieri, P. Clonal analysis of colonizing group B Streptococcus, serotype IV, an emerging pathogen in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 3100-4.
- Dogan, B., Schukken, Y.H., Santisteban, C., Boor, K.J. 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among Streptococcus agalactiae isolates from bovine and human hosts. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5899-906.
- Doran, K.S., Chang, J.C., Benoit, V.M., Eckmann, L., Nizet, V. 2002. Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 196–203.
- Doran, K.S., Nizet, V. 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Molecular Microbiology* 54: 23-31.
- Elliott, J.A., Facklam, R.R, Richter, C.B. 1990. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs and fish. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 628-630.
- Eschenbach, D.A. 2002. Prevention of neonatal group B streptococcal infection. *The New England Journal of Medicine* 347: 280-1.
- Facklam, R. 1995. Group B streptococcal infection in older patients. Spectrum of disease and management strategies. *Drugs Aging* 6: 293-300.
- Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 613-630.

- Farley, M.M., Harvey, R.C., Stull, T., Smith, J.D., Schuchat, A., Wenger, J.D., Stephens, D.S. 1993. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *The New England journal of medicine* 328: 1807-11.
- Farley, M.M. 2001. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases* 33: 556-61.
- Ferrieri, P., Gray, E.D., Wannamaker, L.W. 1980. Biochemical and immunological characterization of the extracellular nucleases of group B streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*. 151: 56-68.
- Ferrieri, P., Gray, E.D., Wannamaker, L.W. 1975. Group B streptococcal nucleases: further biochemical and immunological characterization. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 19.
- Finch, L.A., Martin, D.R. 1984. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. *The Journal of Applied Bacteriology* 57: 273-8.
- Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacorsi, S., Le Thomas, I., Deforche, D., Bingen, E. 2001. Mechanisms of macrolide resistance in clinical group B streptococci isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1889-91.
- Flemming, H.C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-33.
- Florindo, C., Viegas, S., Paulino, A., Rodrigues, E., Gomes, J.P., Borrego, M.J. 2010. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. *Clinical Microbiology and Infection* 16: 1458-63.
- Fluegge, K., Wons, J., Spellerberg, B., Swoboda, S., Siedler, A., Hufnagel, M., Berner, R. 2011. Genetic differences between invasive and noninvasive neonatal group B streptococcal isolates. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 30: 1027-31.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D., Marrs, C.F. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovation* 2: 10.
- Franciosi, R.A., Knostman, J.D., Zimmerman, R.A. 1973. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *The Journal of Pediatrics* 82: 707-18.

Franken, C., Haase, G., Brandt, C., Weber-Heynemann, J., Martin, S., Lämmle, C., Podbielski, A., Lütticken, R., Spellerberg, B. 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Molecular Microbiology* 41: 925–935.

Fry, R.M. 1938. Prevention and control of puerperal sepsis: bacteriological aspects. *British Medical Journal* 2: 340-2.

Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology* 176: 231-41.

Garrity, G.M. 2008. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. 3v. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, New York.

Gherardi, G., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Recchia, S., Orefici, G., Dicuonzo, G., Creti, R. 2007. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2909-16.

Gibbs, R.S., Schrag, S., Schuchat, A. 2004. Perinatal Infections Due to Group B Streptococci. *Obstetrics & Gynecology* 104: 1062-1076.

Gibson, R.L., Nizet, V., Rubens, C.E. 1999. Group B streptococcal  $\beta$ -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatric Research* 45: 626–634.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couvé, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology* 45: 1499-513.

Glass, N., Schulkin, J., Chamany, S., Riley, L., Schuchat, A., Schrag, S. 2005. Opportunities to reduce overuse of antibiotics for perinatal group B streptococcal disease prevention and management of preterm premature rupture of membranes. *Infectious Diseases Obstetrics Gynecology* 13: 5-10.

Gleich-Theurer, U., Aymanns, S., Haas, G., Mauerer, J.V., Vogt, J., Spellerberg, B. 2009. Human serum induces streptococcal C5a peptidase expression. *Infection and Immunity* 77: 3817-3825.



Goller, C.C., Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 37-66.

Gonzalez, J.J., Andreu, A., Spanish Group for the Study of Perinatal Infection from the Spanish Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005. Multicenter study of the mechanisms of resistance and clonal relationships of *Streptococcus agalactiae* isolates resistant to macrolides, lincosamides, and ketolides in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2525-7.

Graça, L.M., 2005. *Medicina Materno-Fetal 2* (2ª Ed), Lidel, Lisboa.

Gygax, S.E., Schuyler, J.A., Kimmel, L.E., Trama, J.P., Mordechai, E., Adelson, M.E. 2006. Erythromycin and clindamycin resistance in group B streptococcal clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1875-7.

Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M.F., Domelier, A.S., Rosenau, A., Quentin, R., Mereghetti, L., Lanotte, P. 2011. A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. *BMC Microbiology* 11: 171.

Hakansson, S., Burman, L.G., Henrichsen, J., Holm, S.E. 1992. Novel coagglutination method for serotyping group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 3268-9.

Henneke, P., Takeuchi, O., Malley, R., Lien, E., Ingalls, R.R., Freeman, M.W., Mayadas, T., Nizet, V., Akira, S., Kasper, D.L., Golenbock, D.T. 2002. Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways. *Journal of Immunology* 169: 3970-3977.

Henry, J., 1996. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19th Ed. Saunders, Filadélfia.

Herbert, M.A., Beveridge, C.J., Saunders, N.J. 2004. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17: 225-9.

Herbert, M.A., Beveridge, C.J., McCormick, D., Aten, E., Jones, N., Snyder, L.A., Saunders, N.J. 2005. Genetic islands of *Streptococcus agalactiae* strains NEM316 and 2603VR and their presence in other Group B streptococcal strains. *BMC Microbiology* 5: 31.

Hickman, M.E., Rench, M.A., Ferrieri, P., Baker, C.J. 1999. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics* 104: 203-9.

Holm, S.E., Hakansson, S. 1988. A simple and sensitive enzyme immunoassay for determination of soluble type-specific polysaccharide from group B streptococci. *Journal of Immunological Methods* 106: 89-94.

Holt, J.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H. 2008. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, Maryland. 532-533; 552.

Huber, C.A., McOdimba, F., Pflueger, V., Daubenberger, C.A., Revathi, G. 2011. Characterization of invasive and colonizing isolates of *Streptococcus agalactiae* in East African adults. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 3652-5.

Hynes, W.L., Walton, S.L. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 183: 201-7.

Imperi, M., Gherardi, G., Berardi, A., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Dicunzio, G., Orefici, G., Creti, R. 2011. Invasive neonatal GBS infections from an area-based surveillance study in Italy. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 1834-9

Jennings, H.J., Lugowski, C., Kasper, D.L. 1981. Conformational aspects critical to the immunospecificity of the type III group B streptococcal polysaccharide. *Biochemistry* 20: 4511-8.

Jennings, H.J., Katzenellenbogen, E., Lugowski, C., Kasper, D.L. 1983. Structure of native polysaccharide antigens of type Ia and type Ib group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 22: 1258-64.

Jennings, H.J., Rosell, K.G., Katzenellenbogen, E., Kasper, D.L. 1983. Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II group B *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry* 258: 1793-8.

Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D.W., Harding, R.M., Bisharat, N., Spratt, B.G. 2003. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2530-6.

Karatan, E., Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 73: 310-47.

Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W., Horswill, A.R. 2011. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PloS One* 6: e26714.

Kilian, M., In, P., Borriello, P. R., Murray, G., Funke. *Streptococcus and Lactobacillus* .2005. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Hodder Arnold, London, United Kingdom.

Kogan, G., Brisson, J.R., Kasper, D.L., von Hunolstein, C., Orefici, G., Jennings, H.J. 1995. Structural elucidation of the novel type VII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 277: 1-9.

Kogan, G., Uhrin, D., Brisson, J.R., Paoletti, L.C., Blodgett, A.E., Kasper, D.L., Jennings, H.J. 1996. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 8786-90.

Koneman, E.W. 2005. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Lippincott: Williams & Wilkins.

Kong, F., Gowan, S., Martin, D., James, G., Gilbert, G.L. 2002. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: relationship to molecular serotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 620-6.

Kong, F., Lambertsen, L.M., Slotved, H.C., Ko, D., Wang, H., Gilbert, G.L. 2008. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2745-50.

Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., Dramsi, S. 2009. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens* 5: e1000422.

Kunze, M., Ziegler, A., Fluegge, K., Hentschel, R., Proempeler, H., Berner, R. 2011. Colonization, serotypes and transmission rates of group B streptococci in pregnant women and their infants born at a single University Center in Germany. *Journal of Perinatal Medicine* 39: 417-22.

Lachenauer, C.S., Kasper, D.L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., Paoletti, L.C., Ferrieri, P., Madoff, L.C. 1999. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *Journal of Infectious Diseases* 179: 1030-1033.

Lambertsen, L., Ekelund, K., Skovsted, I.C., Liboriussen, A., Slotved, H.C. 2010. Characterisation of invasive group B streptococci from adults in Denmark 1999 to 2004. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29: 1071-7.

Lammler, C., Abdulmawjood, A., Weiss, R. 1998. Properties of serological group B streptococci of dog, cat and monkey origin. *Zentralbl Veterinarmed B* 45: 561-6.

Lancefield, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine* 57: 571-95.

Lancefield, R.C. 1934. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *Journal of Experimental Medicine* 59: 441-58.

Lancefield, R.C., Hare, R. 1935. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *Journal of Experimental Medicine* 61: 335-49.

Lauer, P., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Margarit, I., Maione, D., Rosini, R., Taddei, A. R., Mora, M., Rappuoli, R., Grandi, G., Telford, J.L. 2005. Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. *Science* 309: 105.

Leclercq, R., Courvalin, P. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 1267-1272.

Lin, F., Sintchenko, V., Kong, F., Gilbert, G.L., Coiera, E. 2009. Commonly used molecular epidemiology markers of *Streptococcus agalactiae* do not appear to predict virulence. *Pathology* 41 :576-81.

Lin, F.Y., Whiting, A., Adderson, E., Takahashi, S., Dunn, D.M., Weiss, R., Azimi, P.H., Philips, J.B., Weisman, L.E., Regan, J., Clark, P., Rhoads, G.G., Frasch, C.E., Troendle, J., Moyer, P., Bohnsack, J.F. 2006. Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B *Streptococci* from neonates: a multicenter prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* 44:1257-61.

Lindahl, G., Stalhammar-Carlemalm, M., Areschoug, T. 2005. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 18:102-127.

Lindstedt, B.A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26: 2567-2582.

Liu, G.Y., Nizet, V. 2004. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. *Frontiers in Bioscience* 9: 1794-802.

Luan, S.L., Granlund, M., Sellin, M., Lagergard, T., Spratt, B.G., Norgren, M. 2005. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 3727-33.

Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C.D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E.T., Rosini, R., D'Agostino, N., Miorin, L., Buccato, S., Mariani, M., Galli, G., Nogarotto, R., Nardi, Dei, V., Vegni, F., Fraser, C., Mancuso, G., Teti, G., Madoff, L.C., Paoletti, L.C., Rappuoli, R., Kasper, D.L., Telford, J.L., Grandi, G. 2005. Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen. *Science*. 309: 148-150.

Maisey, H.C., Doran, K.S., Nizet, V. 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10: e27.

Manning, S.D., Springman, A.C., Lehotzky, E., Lewis, M.A., Whittam, T.S., Davies, H.D. 2009. Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 1143-8.

Martin, P., van de Ven, T., Mouchel, N., Jeffries, A.C., Hood, D.W., Moxon, E.R. 2003. Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Molecular Microbiology* 50: 245-257.

Martins, E.R., Pessanha, M.A., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. 2007. Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3224-9.

Martins, E.R., Melo-Cristino, J., Ramirez, M. 2010. Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae*. *Journal Bacteriology* 192: 1361-9

Matthies, C., Gössner, A., Acker, G., Schramm, A., Drake, H.L. 2004. *Lactovum miscens* gen. nov., sp. nov., an aerotolerant, psychrotolerant, mixed-fermentative anaerobe from acidic forest soil. *Research in Microbiology* 155: 847-54.

Mavenyengwa, R.T., Maeland, J.A., Moyo, S.R. 2008. Distinctive features of surface-anchored proteins of *Streptococcus agalactiae* strains from Zimbabwe revealed by PCR and dot blotting. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 1420-4.

McCracken, G.H. 1973. Group B streptococci: the new challenge in neonatal infections. *The Journal of Pediatrics* 82: 703-6.

Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., van Belkum A. 2007. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology Methods* 69: 371-5.

Menegazzi, R., Decleva, E., Dri, P. 2012. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood* 119: 1214-6.

Michon, F., Brisson, J.R., Dell, A., Kasper, D.L., Jennings, H.J. 1988. Multiantennary group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 27: 5341-5351.

Michon, F., Katzenellenbogen, E., Kasper, D.L., Jennings, H.J. 1987. Structure of the complex group-specific polysaccharide of group B *Streptococcus*. *Biochemistry* 26: 476-486.

Moore, M.R., Schrag, S.J., Schuchat, A. 2003. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 201-13.

Negano, N. 2008. Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B *Streptococci* with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 4258-4267.

Nobbs, A.H., Lamont, R.J., Jenkinson, H.F. 2009. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 3: 407-50.

Palacios, G.C., Eskew, E.K., Solorzano, F., Mattingly, S.J. 1997. Decreased capacity for type-specific-antigen synthesis accounts for high prevalence of nontypeable strains of group B streptococci in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2923-6.

Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Zansky, S.M., Gershman, K., Stefonek, K.R., Albanese, B.A., Zell, E.R., Schuchat, A., Schrag, S.J.; Active Bacterial Core surveillance/Emerging Infections Program Network. 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 299: 2056-65.

Pourcel, C., Hormigos, K., Onteniente, L., Sakwinska, O., Deurenberg, R.H., Vergnaud, G. 2009. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 3121-3128.

Poyart, C., Réglier-Poupet, H., Tazi, A., Billoët, A., Dmytruk, N., Bidet, P., Bingen, E., Raymond, J., Trieu-Cuot, P. Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1647-9.

Puopolo, K.M., Madoff, L.C. 2003. Upstream short sequence repeats regulate expression of the alpha C protein of group B *Streptococcus*. *Molecular Microbiology* 50: 977-91.

Quentin, R., Huet, H., Wang, F.S., Geslin, P., Goudeau, A., Selander, R.K. 1995. Characterization of *Streptococcus agalactiae* strains by multilocus enzyme genotype and serotype: identification of multiple virulent clone families that cause invasive neonatal disease. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2576-81.

Rajagopal, L. 2009. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology* 4: 201-21.

Ramaswamy, S.V., Ferrieri, P., Flores, A.E., Paoletti, L.C. 2006. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2398-403.

Rantz, L., Kirby, W.M. 1942. Hemolytic streptococcus bacteremia: report of thirteen cases with special reference to serologic groups of etiologic organisms. *New England Journal of Medicine*. 227: 730-733.

Rato, M., Bexiga, R., Nunes, S., Cavaco, L., Vilela, C., Santos-Sanches, I. 2008. Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science* 91: 4542-4551.

- Rato, M.G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L.M., Vilela, C.L., Santos-Sanches, I. 2012. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*.
- Remijsen, Q., Kuijpers, T.W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T. 2011. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation* 18: 581-8.
- Rice, L.B., Carias, L.L., Hutton-Thomas, R., Rudin, S. 2007 Interaction of related Tn916-like transposons: Analysis of excision events promoted by Tn916 and Tn5386 integrases. *Journal of Bacteriology* 189:3909–3917.
- Richards, V.P., Lang, P., Bitar, P.D., Lefébure, T., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., Stanhope, M.J. 2011. Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1263-75.
- Rinaudo, C.D., Rosini, R., Galeotti, C.L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., Ghezzi, C., Telford, J.L., Grandi, G., Maione, D. 2010. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One* 5: e9216.
- Ring, A., Depnering, C., Pohl, J., Nizet, V., Shenep, J.L., Stremmel, W. 2002. Synergistic action of nitric oxide release from murine macrophages caused by group B streptococcal cell wall and beta-hemolysin/cytolysin. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1518-21.
- Rosato, A., Vicarini, H., Leclercq, R. 1999. Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 43: 559-562.
- Rubens, C.E., Raff, H.V., Jackson, J.C., Chi, E.Y., Bielitzki, J.T., Hillier, S.L. 1991. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *Journal of Infectious Disease* 164: 320-30.
- Safadi, R., Amor, S., Hery-Arnaud, G., Spellerberg, B., Lanotte, P., Mereghetti, L., Gannier, F., Quentin, R., Rosenau, A. 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-lmb* intergenic region. *PLoS One* 5: e10794.



Sanchez, C.J., Shivshankar, P., Stol, K., Trakhtenbroit, S., Sullam, P.M., Sauer, K., Hermans, P.W., Orihuela, C.J. 2010. The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathogens* 6: e1001044.

Schrag, S.J., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K., Schuchat, A. 2002. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC: *MMWR Recommendations and Reports* / 6;51(RR-11):1-22.

Schrag, S.J., Zywicki, S., Farley, M.M., Reingold, A.L., Harrison, L.H., Lefkowitz, L.B., Hadler, J.L., Danila, R., Cieslak, P.R., Schuchat, A. 2000. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *New England Journal of Medicine* 342: 15-20.

Schuchat, A. 1996. Guidelines for prevention of perinatal group B streptococcal disease. *HMO Practice* 10: 190-1.

Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 497-513.

Schuchat, A. 1999. Group B streptococcus. *The Lancet*, 353: 51-56.

Schuchat, A. 2000. Neonatal group B streptococcal disease--screening and prevention. *New England Journal of Medicine* 343: 209-10.

Schuchat, A. 2001. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clinical Infectious Diseases* 33: 751-756.

Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*. 34:475-491.

Seifert, K.N., Adderson, E.E., Whiting, A.A., Bohnsack, J.F., Crowley, P.J., Brady, L.J. 2006. A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (epsilon) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* 152: 1029-40.

Sellin, M., Olofsson, C., Hakansson, S., Norgren, M. 2000. Genotyping of the capsule gene cluster (cps) in nontypeable group B streptococci reveals two major cps allelic variants of serotypes III and VII. *Journal Clinical Microbiology* 38: 3420-8.

Seppala, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., Huovinen, P. 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 257-62.

Shanson, D.C., Speller, D.C. 2000. *Microbiology in Clinical Practice*. 3rd Ed. Butter Worth and Heinemann, UK.

Sinha, A., Lieu, T., Paoletti, L., Weinstein, M., Platt, R. 2005. The projected health benefits of maternal group B streptococcal vaccination in the era of chemoprophylaxis. *Vaccine* 23:3187-3195.

Skoff, T.H., Farley, M.M., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Gershman, K., Harrison, L.H., Lynfield, R., Mohle-Boetani, J., Zansky, S., Albanese, B.A., Stefonek, K., Zell, E.R., Jackson, D., Thompson, T., Schrag, S.J. 2009. Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990-2007. *Clinical Infectious Diseases* 49: 85-92.

Slotved, H.C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., Gilbert, G.L. 2007. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2929-36.

Sorensen, U.B., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I., Kilian, M. 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. *MBio* 1: e00178-10.

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heymann, J., Schnitzler, N., Lutticken, R., Podbielski, A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infection and Immunity* 67: 871-8.

Spellerberg, B. 2000. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes and Infection* 2: 1733-42.

Spellerberg, B., Brandt, C. 2007 *Streptococcus*. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Ed. Washington DC: ASM Press 412-429.

Stoll, B.J., Hansen, N., Fanaroff, A.A., Wright, L.L., Carlo, W.A., Ehrenkranz, R.A., Lemons, J.A., Donovan, E.F., Stark, A.R., Tyson, J.E., Oh, W., Bauer, C.R., Korones, S.B., Shankaran, S., Laptook, A.R., Stevenson, D.K., Papile, L.A., Poole, W.K. 2002. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *New England Journal Medicine* 347: 240-7.

Strahl, W., Rouse, H., Fisher, B. 2001. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology, Lippincott Williams & Wilkins, USA.

Struelens, MJ. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology Infection* 2: 2-11.

Sukhnanand, S. B., Dogan, M. O., Ayodele, R. N., Zadoks, M. P., Craver, N. B., Dumas, Y. H., Schukken, K. J., Boor, M., Wiedmann. 2005. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1177-1186.

Sumby, P., Barbian, K.D., Gardner, D.J., Whitney, A.R., Welty, D.M., Long, R.D., Bailey, J.R., Parnell, M.J., Hoe, N.P., Adams, G.G., Deleo, F.R., Musser, J.M. 2005. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 102: 1679-84.

Tazi, A., Morand, P.C., Réglie-Poupet, H., Dmytruk, N., Billoet, A., Antona, D., Trieu-Cuot, P., Poyart, C. 2011. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010). *Clinical Microbiology Infection* 17: 1587-9.

Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., Mistou, M.Y., Khun, H., Mechler, C., Tardieux, I., Trieu-Cuot, P., Lecuit, M., Poyart, C. 2010. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *Journal of Experimental Medicine* 207: 2313-22.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.

Tettelin, H., Maignani, V., Cieslewicz, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S., Wessels, M.R., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Margarit, I., Read, T.D., Madoff, L.C., Wolf, A.M., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Lewis, M.R., Radune, D., Fedorova, N.B., Scanlan, D., Khouri, H., Mulligan, S., Carty, H.A., Cline, R.T., Van Aken, S.E., Gill, J., Scarselli, M., Mora, M., Iacobini, E.T., Brettoni, C., Galli, G., Mariani, M., Vegni, F., Maione, D., Rinaudo, D., Rappuoli, R., Telford, J.L., Kasper, D.L., Grandi, G., Fraser, C.M. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 99:12391-6.

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M.J., Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., Angiuoli, S.V., Crabtree, J., Jones, A.L., Durkin, A.S., Deboy, R.T., Davidsen, T.M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J.D., Hauser, C.R., Sundaram, J.P., Nelson, W.C., Madupu, R., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Selengut, J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Zafar, N., Khouri, H., Radune, D., Dimitrov, G., Watkins, K., O'Connor, K.J., Smith, S., Utterback, T.R., White, O., Rubens, C.E., Grandi, G., Madoff, L.C., Kasper, D.L., Telford, J.L., Wessels, M.R., Rappuoli, R., Fraser, C.M. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 102: 13950-5.

Tolun, G., Myers, R.S. 2003. A real-time DNase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence. *Nucleic Acids Research* 31: e111.

Triscott, M.X., Davis, G.H. 1979. A comparison of four methods for the serotyping of group B streptococci. *Journal of Experimental Biology and Medicine Science* 57: 521-527.

Turow, J., Spitzer, A.R. 2000. Group B streptococcal infection early onset disease controversies in prevention guidelines, and management strategies for the neonate. *Clinical Pediatrics* 39: 317-326.

Tyrrell, G.J., Senzilet, L.D., Spika, J.S., Kertesz, D.A., Alagaratnam, M., Lovgren, M., Talbot, J.A. 2000. Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study--1996. *Sentinel Health Unit Surveillance System Site Coordinators. Journal of Infectious Diseases* 182: 168-73.

von Köckritz-Blickwede, M., Nizet, V. 2009. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *Journal of Molecular Medicine*. 87: 775-783.

von Hunolstein, C., D'Ascenzi, S., Wagner, B., Jelínková, J., Alfarone, G., Recchia, S., Wagner, M., Orefici, G. 1993. Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). *Infection and Immunity* 61: 1272-80.

Wanger, A.R., Dunne, G.M. 1987. Identification of a *Streptococcus agalactiae* protein antigen associated with bovine mastitis isolates. *Infection and Immunity* 55: 1170-5.

Wehbeh, W., Rojas-Diaz, R., Li, X., Mariano, N., Grenner, L., Segal-Maurer, S., Tommasulo, B., Drlica, K., Urban, C., Rahal, J.J. 2005. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae*: epidemiology and mechanism of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2495-7.

Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 577-585.

Weisner, A.M., Johnson, A.P., Lamagni, T.L., Arnold, E., Warner, M., Heath, P.T., Efstratiou, A. 2004. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clinical and Infectious Diseases* 38: 1203-8.

Wessels, M.R., Pozsgay, V., Kasper, D.L., Jennings, H.J. 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B *Streptococcus*. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *Journal of Biological Chemistry* 262: 8262-7.

Wessels, M.R., Benedí, W.J., Jennings, H.J., Michon, F., DiFabio, J.L., Kasper, D.L. 1989. Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *Infection and Immunity* 57: 1089-94.

Wessels, M.R., DiFabio, J.L., Benedi, V.J., Kasper, D.L., Michon, F., Brisson, J.R., Jelínková, J., Jennings, H.J. 1991. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 266: 6714-9.

Wilkinson, H.W., Moody, M.D. 1969. Serological relationships of type I antigens of group B streptococci. *Journal of Bacteriology* 97: 629-634.

Zuerlein, T.J, Christensen, B., Hall, R.T. 1991. Latex agglutination detection of group-B streptococcal inoculum in urine. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 14: 191-194.

# **ANEXOS**

# Anexo I

Iniciadores (“*Primers*”) de amplificação e sequenciação de DNA utilizados no presente trabalho

<i>Locus</i>	Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) <sup>a</sup>	Sequência do Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) (5’ para 3’)	Amplicação (pb)	Referência Bibliográfica
<i>cpsD-F</i>	cpsD-1	GTTGTTGATGCCGCAATAATC ( <i>Forward</i> ) <sup>b</sup>	1902	Florindo <i>et al.</i> , 2010
	cpsE-1	TCTTACGCTAAGTTTTTCACG	ou 1911	
	cpsF-1	CTACAGCGGCACCAGATGATA ( <i>Reverse</i> ) <sup>c</sup>		
<i>adhP</i>	adhP-1	GTTGGTCATGGTGAAGCACT ( <i>Forward</i> )	672	Jones N <i>et al.</i> , 2003
	adhP-2	ACTGTACCTCCAGCACGAAC ( <i>Reverse</i> )		
<i>pheS</i>	pheS-1	GATTAAGGAGTAGTGGCACG ( <i>Forward</i> )	723	
	pheS-2	TTGAGATCGCCATTGAAAT ( <i>Reverse</i> )		
<i>atr</i>	atr-1	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA ( <i>Forward</i> )	627	
	atr-2	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT ( <i>Reverse</i> )		
<i>glnA</i>	glnA-1	CCGGCTACAGATGAACAATT ( <i>Forward</i> )	589	
	glnA-2	CTGATAATTGCCATTCCACG ( <i>Reverse</i> )		
<i>sdhA</i>	sdhA-1	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC ( <i>Forward</i> )	646	
	sdhA-2	ATATCAGCAGCAACAAGTGC ( <i>Reverse</i> )		
<i>glcK</i>	glcK-1	CTCGGAGGAACGACCATTA ( <i>Forward</i> )	607	
	glcK-2	CTTGTAACAGTATCACCGTT ( <i>Reverse</i> )		

Iniciadores (“*Primers*”) de amplificação e sequenciação de DNA utilizados no presente trabalho (cont.)

<i>Locus</i>	Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) <sup>a</sup>	Sequência do Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) (5’ para 3’)	Amplicação (pb)	Referência Bibliográfica
<i>tkt</i>	tk1-1	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA ( <i>Forward</i> )	859	Jones N <i>et al.</i> , 2003
	adhP-2	ACTGTACCTCCAGCACGAAC ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG2</i>	SAG2F	TCTTCCAAGTGGTGTCAACG ( <i>Forward</i> )	244	Haguenoer <i>et al.</i> , 2011
	SAG2R	CAACGTTTGGAGTTGCTTCA ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG3</i>	SAG3F	CAAAAACGTGCTGCCTATGA ( <i>Forward</i> )	126	
	SAG3R	CATCCCTCCTCCACCAAAA ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG4</i>	SAG4F	GGTCAGTTTTTATTTATCGTAAGC ( <i>Forward</i> )	114	
	SAG4R	AGTCTTGCGAAGGCAGACAC ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG7</i>	SAG7F	TGGTGTGATAAAAGTTGATGTTCC ( <i>Forward</i> )	285	
	SAG7R	GCCATATGAACTGCGGAAAC ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG21</i>	SAG21F	TGAAAGAAGTGGATTTTCCCTA ( <i>Forward</i> )	783	
	SAG21R	AAAATAGGTTTTAGAACTTGAAATCA ( <i>Reverse</i> )		
<i>SAG22</i>	SAG22F	TGTAACACTAGCTCCAATTTGTTTT ( <i>Forward</i> )	928	
	SAG22R	TCGGTCTTGTCTCAGCAATG ( <i>Reverse</i> )		



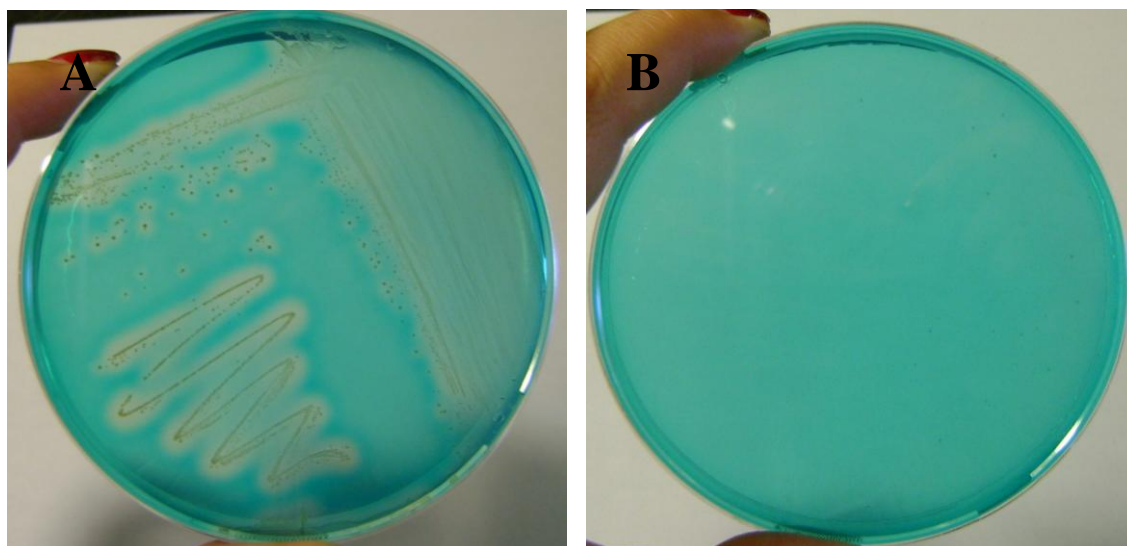
Iniciadores (“*Primers*”) de amplificação e sequenciação de DNA utilizados no presente trabalho (cont.)

<i>Locus</i>	Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) <sup>a</sup>	Sequência do Iniciador (“ <i>Primer</i> ”) (5’ para 3’)	Amplicação (pb)	Referência Bibliográfica
<i>ermA</i>	ermA-1	GAAGTTTAGCTTTCCTAA ( <i>Forward</i> )	639	Florindo <i>et al.</i> 2010
	ermA-2	GCTTCAGCACCTGTCTTAATTGAT ( <i>Reverse</i> )		
<i>ermB</i>	ermB-1	GAAAAGGTACTCAACCAAATA ( <i>Forward</i> )	395	
	ermB-2	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC ( <i>Reverse</i> )		
<i>mefA</i>	mefA-1	AGTATCATTAATCACTAGTGC ( <i>Forward</i> )	346	
	mefA-2	TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG ( <i>Reverse</i> )		
<i>scpB-lmb</i>	scpB3382	TTATGACCACTTTCTTCTTGGA ( <i>Forward</i> )	400, 2200 ou 1600	
	rlmb51	CTATCATTACTAAACTCACAAC ( <i>Reverse</i> )		
	“ <i>Primer</i> ” Universal	TGATACTTCACAGACGAAACAACG ( <i>Forward</i> )	-	
	Alpha-C	TACATGTGGTAGTCCATCTTCACC ( <i>Reverse</i> )	398	
<i>Alpha-like protein (Alp)</i>	Rib	CATACTGAGCTTTTAAATCAGGTGA ( <i>Reverse</i> )	295	Creti <i>et al.</i> , 2004
	Epsilon (Alp1)	CCAGATACATTTTTTACTAAAGCGG ( <i>Reverse</i> )	200	
	Alp2/3	CACTCGGATTACTATATATTAGCAC ( <i>Reverse</i> )	334	
	Alp4	TTAATTTGCACCGGATTAACACCAC ( <i>Reverse</i> )	110	

<sup>a</sup>Todos os iniciadores foram utilizados em amplificação e sequenciação, com exceção do cps-E, o qual foi apenas utilizado em sequenciação; <sup>b</sup>“*Forward*” – “*Primer*” ou Iniciador directo; <sup>c</sup>“*Reverse*” – “*Primer*” ou Iniciador inverso.

## Anexo II

Ensaio qualitativo da actividade das DNases extracelulares em placas de *DNA methyl green agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).



(A) estirpe *S. agalactiae* de referência (origem humana), O90R, produtora de DNases após 24h de incubação a 37°C; (B) estirpes *S. agalactiae* (origem humana) de infecção CC19, não produtora de DNases após 24h de incubação a 37°C.